

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA



**Estudio de la respuesta  
histopatológica testicular al  
tratamiento con estrógenos y  
antiandrógenos a largo plazo y su  
relación con la disgenesia testicular**

TESIS DOCTORAL

**Cristina Peña Barreno**

Madrid, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía Patológica



**Estudio de la respuesta  
histopatológica testicular al  
tratamiento con estrógenos y  
antiandrógenos a largo plazo y su  
relación con la disgenesia testicular**

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Medicina y Cirugía

**Cristina Peña Barreno**

**Directores de la Tesis**

María del Pilar González-Peramato Gutiérrez

Manuel Nistal Martín de Serrano

**Dedico este proyecto a:**

Mi padre, por despertar y mantener mi curiosidad y amor por el aprendizaje.

Mi madre, por su apoyo y amor incondicional.

Mi hermana, porque cree en mí y me da fuerzas para ser mejor persona.

Nicolás, porque a pesar de la dedicación de esta profesión decide compartir  
su vida conmigo.

Mis amistades, por aceptarme, valorarme, apoyarme, darme fuerzas,  
dedicarme su tiempo y sentir todo lo que me pasa como si les pasara a ellos.

## ***AGRADECIMIENTOS***



## **AGRADECIMIENTOS**

Doy las gracias a la Dra. Pilar González-Peramato y al Dr. Manuel Nistal por aceptar ser mis directores y acompañarme, guiarme, enseñarme, ayudarme y apoyarme durante el desarrollo de la presente tesis doctoral.

Agradezco al Hospital Universitario La Paz y especialmente al Servicio de Anatomía Patológica, a todo el equipo, incluyendo personal médico de plantilla, residentes, personal técnico de laboratorio, administrativos y celadores por los ánimos que me han dado durante el desarrollo de la tesis doctoral y por la disponibilidad otorgada de los materiales y métodos.

Gracias a María Jesús Lucio Pérez, socióloga del Hospital Universitario Ramón y Cajal, por su generosa colaboración para la recolección de los consentimientos informados y a todas las instituciones y personas que han hecho posible la realización de este proyecto.

Fuera del ámbito profesional agradezco el apoyo de mi familia y amigos, con ellos todo es más fácil.

## ***ÍNDICE***

## Índice

Lista de Tablas .....	I
Lista de Figuras .....	II
Lista de abreviaturas .....	III
Resumen .....	IV
Abstract .....	V
<b>Introducción</b> .....	1
1. Antecedentes y retos actuales .....	3
2. Fisiología de los estrógenos .....	5
2.1. Producción .....	5
2.2. Mecanismos de señalización .....	6
2.3. Degradación .....	7
3. Papel de los estrógenos en la espermatogénesis .....	7
3.1. Apoptosis/supervivencia .....	8
3.2. Proliferación/diferenciación .....	9
3.3. Metabolismo .....	9
3.4. Citoesqueleto, uniones intercelulares y transporte .....	11
3.5. Acciones de la progesterona .....	12
3.6. Eje hipotálamo-hipofisario-gonadal .....	13
4. Disruptores endocrinos .....	13
5. Patologías en las que están implicados los estrógenos .....	16
5.1. Cáncer y metástasis .....	16
5.2. Enfermedades inmunológicas .....	18
5.3. Enfermedades endocrinometabólicas y cardiovasculares .....	21
5.4. Enfermedades neuropsiquiátricas y alteraciones conductuales ...	27
5.5. Patología dermatológica y del tracto genitourinario .....	29
5.6. Síndrome de disgenesia testicular .....	32
6. Terapia hormonal cruzada .....	37
6.1. Estudio histológico del testículo en individuos transgénero de varón a mujer .....	39
<b>Hipótesis y objetivos</b> .....	41
<b>Material y métodos</b> .....	45

1. Material .....	47
2. Métodos .....	47
2.1. Fijación del tejido testicular .....	47
2.2. Tallado, secciones con microtomo y tinciones histológicas .....	47
2.3. Tinciones inmunohistoquímicas .....	49
2.4. Estudio macroscópico .....	49
2.5. Estudio de la respuesta histopatológica al tratamiento .....	50
2.5.1. Estudio histopatológico del parénquima testicular .....	51
2.5.2. Estudio histopatológico de las vías espermáticas .....	53
2.5.3. Túnica vaginal .....	54
2.5.4. Estudio histopatológico de las estructuras vasculares .....	54
2.5.5. Estudio histopatológico de la albugínea .....	55
2.6. Estudio inmunohistoquímico .....	55
2.7. Variables clínicas .....	58
2.8. Manejo de datos .....	59
2.9. Evaluación de la relación entre los hallazgos encontrados y el síndrome de disgenesia testicular .....	59
2.10. Técnicas fotográficas .....	59
2.11. Aspectos éticos .....	60
<b>Resultados</b> .....	61
1. Estudio morfológico .....	63
1.1. Patrones histológicos del parénquima testicular .....	63
1.2. Volumen testicular .....	65
1.3. Tubos seminíferos .....	65
1.3.1. Epitelio seminífero .....	67
1.3.2. Células germinales .....	68
1.3.3. Pared tubular .....	71
1.4. Intersticio .....	73
1.4.1. Células de Leydig .....	73
1.5. Vías espermáticas .....	77
1.5.1. Rete testis .....	77
1.5.2. Epidídimo .....	78
1.6. Células inflamatorias .....	82

1.7. Estructuras vasculares .....	84
1.8. Túnica vaginal .....	86
1.9. Albugínea .....	87
2. Estudio inmunohistoquímico .....	87
2.1. Tubos seminíferos .....	88
2.1.1. Células germinales y epitelio seminífero .....	88
2.1.1.1. D2-40 y CK8/18/19 .....	88
2.1.1.2. Inhibina y calretinina .....	89
2.1.1.3. Receptor de andrógenos y de progesterona .....	91
2.1.2. Pared tubular .....	92
2.1.2.1. Colágeno IV, actina y CD34 .....	92
2.1.2.2. Receptor de andrógenos y de progesterona .....	94
2.2. Intersticio .....	95
2.2.1. Células estromales CD34+ .....	95
2.2.2. Células de Leydig .....	97
2.2.2.1. Inhibina y calretinina .....	97
2.2.2.2. Receptor de andrógenos y de progesterona .....	98
2.2.3. Macrófagos .....	99
2.2.3.1. CD68 .....	99
2.2.3.2. Relación células de Leydig/macrófagos .....	99
2.2.4. Mastocitos .....	100
2.3. Vías espermáticas .....	100
2.3.1. Rete testis .....	100
2.3.1.1. Receptor de estrógenos, andrógenos y progesterona .....	100
2.3.2. Epidídimo .....	101
2.3.2.1. Receptor de estrógenos y andrógenos .....	101
2.3.2.2. Receptor de progesterona .....	104
2.4. Albugínea .....	105
2.4.1. Actina .....	105
3. Terapia hormonal .....	107
3.1. Tipos de tratamientos .....	107
3.1.1. Relación entre tratamiento y patrón histológico .....	108
3.2. Datos relevantes de la terapia hormonal .....	108

3.2.1. Datos relevantes de la terapia hormonal en relación con el patrón histológico predominante.....	109
3.3. Datos hormonales .....	110
3.3.1. Datos hormonales en relación con el patrón histológico predominante .....	110
3.3.2. Datos hormonales en relación con el tratamiento .....	111
<b>Discusión</b> .....	113
<b>Conclusiones</b> .....	149
<b>Referencias bibliográficas</b> .....	153
<b>Anexo 1</b> .....	185

## ***LISTA DE TABLAS***

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Regímenes hormonales recomendados en las mujeres transgénero .....	39
<b>Tabla 2.</b> Resumen de las características de la población del estudio .....	47
<b>Tabla 3.</b> Resumen de los métodos de fijación, tinciones histológicas y métodos de montaje empleados .....	48
<b>Tabla 4.</b> Resumen de los anticuerpos utilizados .....	49
<b>Tabla 5.</b> Resumen de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos y estructuras o células valoradas .....	58
<b>Tabla 6.</b> Características morfológicas de los patrones histológicos testiculares .....	64
<b>Tabla 7.</b> Piezas de orquiectomía bilateral, clasificadas según el patrón histológico predominante .....	65
<b>Tabla 8.</b> Volúmenes testiculares medios (rango), según el patrón histológico .....	65
<b>Tabla 9.</b> Diámetro tubular medio, espacio intertubular medio y número de pacientes en los que se observó ectasia y/o pérdida de luz tubular, según el patrón histológico .....	67
<b>Tabla 10.</b> Número de pacientes en los que se observaron tubos atróficos similares a tubos hipoplásicos, según el patrón histológico .....	67
<b>Tabla 11.</b> Número de pacientes que mostraron alteraciones en las células de Sertoli y morfología nuclear de las mismas, según el patrón histológico .....	68
<b>Tabla 12.</b> Proporción de células germinales presentes en los pacientes, según el patrón histológico .....	69
<b>Tabla 13.</b> Patrones de espermatogénesis observados en los pacientes, según el patrón histológico .....	69
<b>Tabla 14.</b> Número de pacientes en los que se observaron alteraciones en las espermatogonias, según el patrón histológico predominante .....	71
<b>Tabla 15.</b> Número de pacientes que mostraron células germinales apoptóticas y/o alteraciones en los espermatoцитos y/o en las espermátidas, según el patrón histológico predominante .....	71
<b>Tabla 16.</b> Espesor de los componentes de la pared tubular y proporción de tubos seminíferos completamente hialinizados, según el patrón histológico .....	73
<b>Tabla 17.</b> Número de pacientes que presentaron una distribución anormal de las células de Leydig, según el patrón histológico .....	74
<b>Tabla 18.</b> Número de pacientes con alteraciones del tamaño y/o citoplasmáticas en las células de Leydig, según el patrón histológico .....	76
<b>Tabla 19.</b> Número de pacientes con alteraciones nucleares y morfología nuclear de las células de Leydig, según el patrón histológico .....	76
<b>Tabla 20.</b> Número de pacientes que mostraron lesiones en la rete testis, según el patrón histológico .....	78
<b>Tabla 21.</b> Diámetro medio (rango) del conducto epididimario y de los conductillos eferentes, según el patrón histológico .....	78
<b>Tabla 22.</b> Número de pacientes que presentaron alteraciones en los conductillos eferentes, según el patrón histológico .....	79
<b>Tabla 23.</b> Número de pacientes con lesiones en el conducto principal del epidídimo, según el patrón histológico .....	81



<b>Tabla 24.</b> Número de pacientes con otras lesiones y hallazgos asimétricos en el epidídimo, según el patrón histológico .....	81
<b>Tabla 25.</b> Número de pacientes que mostraron infiltrados inflamatorios en los tubos seminíferos, el espacio intersticial y la túnica vaginal, según el patrón histológico .....	82
<b>Tabla 26.</b> Número de pacientes con infiltrados inflamatorios a nivel del epidídimo, según el patrón histológico .....	83
<b>Tabla 27.</b> Número de pacientes con aterosclerosis, arteritis y/o epididimitis isquémica, según la ausencia o presencia de factores de riesgo cardiovascular y el patrón histológico predominante .....	85
<b>Tabla 28.</b> Número de pacientes con lesiones vasculares, según el patrón histológico .....	86
<b>Tabla 29.</b> Número de pacientes que mostraron alteraciones a nivel de la túnica vaginal, según el patrón histológico .....	87
<b>Tabla 30.</b> Espesor de la albugínea y número de pacientes que presentaron tubos seminíferos ectópicos, según el patrón histológico .....	87
<b>Tabla 31.</b> Número de pacientes en los que se valoraron las técnicas inmunohistoquímicas	88
<b>Tabla 32.</b> Número de pacientes que expresaron D2-40 en las células de Sertoli, según el patrón histológico predominante .....	88
<b>Tabla 33.</b> Expresión de CK8/18/19 a nivel de las células de Sertoli en las piezas de orquiectomía bilateral de los pacientes, según el patrón histológico predominante .....	89
<b>Tabla 34.</b> Expresión de cuerpos de inhibina en las células de Sertoli, según el patrón histológico predominante .....	91
<b>Tabla 35.</b> Expresión de calretinina en las células de Sertoli, según el patrón histológico predominante .....	91
<b>Tabla 36.</b> Expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en las células de Sertoli, según el patrón histológico predominante .....	92
<b>Tabla 37.</b> Expresión de actina en la pared tubular, según el patrón histológico predominante	94
<b>Tabla 38.</b> Expresión de CD34 en la pared tubular, según el patrón histológico predominante	94
<b>Tabla 39.</b> Expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en la pared tubular, según el patrón histológico predominante .....	95
<b>Tabla 40.</b> Expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en las células estromales CD34+, según el patrón histológico predominante .....	96
<b>Tabla 41.</b> Expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en las células de Leydig, según el patrón histológico predominante .....	98
<b>Tabla 42.</b> Promedio (rango) de macrófagos intersticiales y peritubulares por tubo y número de pacientes que mostraron macrófagos intratubulares, según el patrón histológico .....	99
<b>Tabla 43.</b> Número de pacientes con alteración de la relación células de Leydig/macrófagos, según el patrón histológico predominante .....	99
<b>Tabla 44.</b> Número de pacientes con mastocitos intratubulares y conteo de mastocitos, según el patrón histológico predominante .....	100
<b>Tabla 45.</b> Expresión del receptor de estrógenos, andrógenos y progesterona en el epitelio de la rete testis, según el patrón histológico predominante .....	101
<b>Tabla 46.</b> Expresión del receptor de estrógenos y de andrógenos en el epidídimo, según el patrón histológico predominante .....	104

<b>Tabla 47.</b> Expresión del receptor de progesterona en el epidídimo, según el patrón histológico predominante .....	105
<b>Tabla 48.</b> Expresión de actina en la albugínea, según el patrón histológico predominante .....	106
<b>Tabla 49.</b> Hallazgos morfológicos e inmunohistoquímicos más importantes, de más a menos frecuentes .....	106
<b>Tabla 50.</b> Resumen de los diferentes tratamientos hormonales recibidos por los pacientes .....	107
<b>Tabla 51.</b> Patrón histológico predominante según el tratamiento administrado .....	108
<b>Tabla 52.</b> Datos relevantes de la terapia hormonal .....	109
<b>Tabla 53.</b> Edad (expresada en años) a la que el paciente inició el tratamiento, en relación con el patrón histológico predominante .....	109
<b>Tabla 54.</b> Duración de la terapia hormonal (expresada en años), en relación con el patrón histológico predominante .....	109
<b>Tabla 55.</b> Datos relevantes de la terapia hormonal, en relación con el patrón histológico predominante .....	110
<b>Tabla 56.</b> Niveles hormonales de los pacientes según el patrón histológico predominante .....	110
<b>Tabla 57.</b> Valores de FSH y LH en relación con el tratamiento hormonal .....	111
<b>Tabla 58.</b> Valores de estradiol y testosterona en relación con el tratamiento hormonal .....	112

## ***LISTA DE FIGURAS***

## **Lista de figuras**

<b>Fig.1.</b> Patologías en las que pueden estar implicados los estrógenos .....	4
<b>Fig.2.</b> Representación de los dominios estructurales de los receptores de estrógenos clásicos .....	6
<b>Fig.3.</b> Regulación del metabolismo celular por los estrógenos .....	9
<b>Fig. 4.</b> Consecuencias evolutivas de la exposición a disruptores endocrinos ambientales .....	15
<b>Fig.5.</b> Enfermedades endocrino-metabólicas y cardiovasculares en las que participan los estrógenos y la alteración del balance andrógenos/estrógenos .....	22
<b>Fig. 6.</b> Etiopatogenia del síndrome de disgenesia testicular .....	37
<b>Fig. 7.</b> Patrones histológicos de los tubos seminíferos .....	63
<b>Fig. 8.</b> Cambios morfológicos encontrados en los tubos seminíferos .....	66
<b>Fig. 9.</b> Cambios morfológicos hallados en el epitelio seminífero .....	68
<b>Fig. 10.</b> Hallazgos morfológicos en las células germinales .....	70
<b>Fig. 11.</b> Hallazgos morfológicos en la pared tubular .....	72
<b>Fig. 12.</b> Distribución de las células de Leydig .....	74
<b>Fig. 13.</b> Alteraciones del tamaño y del citoplasma de las células de Leydig .....	75
<b>Fig. 14.</b> Número de pacientes que mostraron células de Leydig extraparenquimatosas y en qué localización, según el patrón histológico predominante .....	76
<b>Fig. 15.</b> Hallazgos morfológicos en la rete testis .....	77
<b>Fig. 16.</b> Alteraciones halladas en los conductillos eferentes .....	78
<b>Fig. 17.</b> Cambios morfológicos encontrados en el conducto principal del epidídimo .....	80
<b>Fig. 18.</b> Infiltrados inflamatorios en el parénquima testicular .....	82
<b>Fig. 19.</b> Infiltrados inflamatorios en el epidídimo .....	83
<b>Fig. 20.</b> Hallazgos morfológicos de vasculitis .....	84
<b>Fig. 21.</b> Otras lesiones arteriales y venosas .....	85
<b>Fig. 22.</b> Alteraciones morfológicas encontradas en la túnica vaginal .....	86
<b>Fig. 23.</b> Expresión de D2-40 y de CK8/18/19 en las células de Sertoli .....	89
<b>Fig. 24.</b> Expresión de cuerpos de inhibina y calretinina en las células de Sertoli .....	90
<b>Fig. 25.</b> Expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en las células de Sertoli .....	92
<b>Fig. 26.</b> Expresión de Colágeno IV, actina y CD34 en la pared tubular .....	93
<b>Fig. 27.</b> Expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en la pared tubular ...	95
<b>Fig. 28.</b> Expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en las células estromales CD34+ .....	96
<b>Fig. 29.</b> Cantidad de células de Leydig intersticiales en los pacientes, según el patrón histológico predominante .....	97
<b>Fig. 30.</b> Expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en las células de Leydig .....	98
<b>Fig. 31.</b> Expresión del receptor de estrógenos, andrógenos y progesterona en la rete testis .....	101

<b>Fig. 32.</b> Expresión del receptor de estrógenos y andrógenos en el epidídimo .....	103
<b>Fig. 33.</b> Expresión del receptor de progesterona en el epidídimo .....	104
<b>Fig. 34.</b> Expresión de actina en los miofibroblastos de la albugínea .....	105

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

## Lista de abreviaturas

<b>≠</b>	Diferentes
<b>A</b>	Ausente
<b>AAA</b>	Aneurisma de aorta ascendente
<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>APL</b>	Alteración del perfil lipídico
<b>D</b>	Difuso/a
<b>d.</b>	Día
<b>DTM</b>	Diámetro Tubular Medio
<b>EI</b>	Endocarditis infecciosa
<b>F</b>	Focal
<b>FSH</b>	Hormona foliculoestimulante
<b>GC</b>	Grasa corporal >30% (bioimpedancia)
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotropina
<b>I.M.</b>	Intramuscular
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal $\geq 30$
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>LHRH</b>	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
<b>M</b>	Media
<b>m.</b>	Mes
<b>N ♀</b>	valores dentro del rango de normalidad del laboratorio para mujer
<b>N ♂</b>	valores dentro del rango de normalidad del laboratorio para varón
<b>n</b>	Número de pacientes

<b>P</b>	Parcheado/a
<b>pac.</b>	Paciente
<b>PHP</b>	Patrón histológico predominante
<b>s.</b>	Semana
<b>TBQ</b>	Tabaquismo
<b>v.o.</b>	Vía oral



***RESUMEN***

Los estrógenos participan en la modulación de múltiples procesos y la alteración del balance andrógenos/estrógenos puede estar implicada en numerosas patologías, como el cáncer, las enfermedades neuro-psiquiátricas, cardiovasculares e inmunológicas y el síndrome de disgenesia testicular. Algunos estudios relacionan el aumento de la incidencia de enfermedades hormonodependientes con la exposición creciente a agentes químicos ubicuos con propiedades estrogénicas.

Por otro lado, el tratamiento con estrógenos y antiandrógenos forma parte del proceso de transición de varón a mujer y cada vez más personas lo solicitan, a pesar de los posibles efectos secundarios. Las piezas de orquiectomía procedentes de estas pacientes han sido previamente analizadas. Pero los estudios incluyen un número pequeño de pacientes y están mayoritariamente centrados en el parénquima testicular.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se han evaluado los cambios morfológicos e inmunohistoquímicos en 42 piezas de orquiectomía bilateral procedentes de cirugías de reasignación de género realizadas en individuos adultos tras tratamiento hormonal prolongado con estrógenos y antiandrógenos. El objetivo de este trabajo ha sido profundizar en el estudio de los efectos que estas hormonas producen en el parénquima testicular y analizar los efectos, hasta ahora muy poco descritos, sobre la vía espermática, estructuras vasculares y células inflamatorias con la intención de dar a conocer posibles implicaciones patológicas. Se ha realizado un detallado estudio morfológico de las diferentes estructuras y células del parénquima testicular, así como de la vía espermática a diferentes niveles con Hematoxilina eosina. También se ha evaluado la expresión de diferentes

marcadores inmunohistoquímicos en estas estructuras que ponen de manifiesto alteraciones funcionales además de morfológicas.

Se han confirmado los hallazgos previamente descritos de 3 patrones histológicos de atrofia progresiva de los tubos seminíferos en relación con la desdiferenciación de las células de Sertoli, evidenciada morfológica e inmunohistoquímicamente, que conlleva una profunda disminución en la espermatogénesis. En el intersticio las células de Leydig también muestran alteraciones morfológicas que sugieren un proceso de desdiferenciación. La vía espermática en sus diferentes niveles muestra atrofia como lesión más frecuente. Se describen por primera vez lesiones vasculares (aterosclerosis y vasculitis) e inflamatorias tanto en el intersticio testicular como en la vía espermática, con frecuencia llamativamente superior a la encontrada en población no tratada en el mismo rango de edad. La severidad de las lesiones fue mayor cuanto mayor fue la dosis administrada y en pacientes que iniciaron el tratamiento con 40 años o más. Con la limitación de la existencia de automedicación en algunos de estos pacientes, los hallazgos del presente trabajo sugieren que la terapia hormonal cruzada en pacientes de cambio de género debe ser administrada en unidades especializadas para garantizar la sistematización de los tratamientos y un adecuado seguimiento clínico.

## ***ABSTRACT***

Estrogens are involved in the regulation of multiple processes and alteration of the androgen to estrogen ratio might be implicated in several diseases, such as cancer, neuropsychiatric and immunological disorders, cardiovascular diseases and testicular dysgenesis syndrome. Some reports relate the increase in hormonal diseases to ubiquitous chemicals with estrogenic properties.

Furthermore, estrogen and anti-androgen therapy is part of the transition process from male to female and more and more people are seeking it, despite potential side effects. Orchiectomy specimens from these patients have been previously analyzed. However, earlier research has been mainly focused on effects on testicular parenchyma and series used small sample sizes.

A morphological and immunohistochemical analysis has been performed on 42 bilateral orchiectomy specimens from adult individuals who underwent gender reassignment surgery after receiving long-term hormone therapy with estrogen and antiandrogens. The current PhD thesis aims to increase the understanding of the effects of cross-sex hormonal treatment on testicular parenchyma and to analyze less well-known effects on epididymis, vascular structures and inflammatory cells, in order to raise awareness of possible pathological implications. A detailed morphological and immunohistochemical analysis has been conducted on the different types of cells and structures of testicular parenchyma as well as on extratesticular spermatid pathway at multiple levels with hematoxylin and eosin. Moreover, the expression of multiple immunohistochemical markers has been assessed on these structures and both morphological and functional alterations have been identified.

The morphology and immunohistochemistry have confirmed previously reported findings, such as the identification of three histological patterns according to progressive tubular atrophy in relation to Sertoli cell dedifferentiation, leading to a severe decrease in spermatogenesis. In the interstitium, Leydig cells also show morphological alterations that suggest a process of dedifferentiation. The most common lesion in the extratesticular spermatogenic pathway has been atrophy. Vascular (atherosclerosis and vasculitis) and inflammatory lesions have been reported for the first time both in the testicular interstitium and the spermatogenic pathway with a significantly higher frequency than in non-treated subjects in the same age range. Lesions were more severe at higher doses and in patients starting hormone therapy at age 40 or later. Taken together and bearing in mind the existence of limitations such as self-medication in some patients, the present findings suggest that cross-sex hormone therapy should be provided in specialized units in order to systematize treatments and ensure adequate follow-up.

# ***INTRODUCCIÓN***

## **INTRODUCCIÓN**

### **1. Antecedentes y retos actuales**

Tradicionalmente los estrógenos y los andrógenos han sido contemplados como las hormonas sexuales femenina y masculina, respectivamente. Pero en los años 30 se identificó que los animales machos también producían estrógenos (1). Más tarde, en la década de 1940 y a lo largo de los años 50 y 60, se constató que la administración de estrógenos provocaba una disminución de la concentración plasmática y urinaria de testosterona (2) y que tanto la alteración de los niveles de estas hormonas como del balance andrógenos/estrógenos tenía implicaciones patológicas (3-5). Además, se identificó el papel fundamental que desempeñan los andrógenos como prohormona para la síntesis de estrógenos (6).

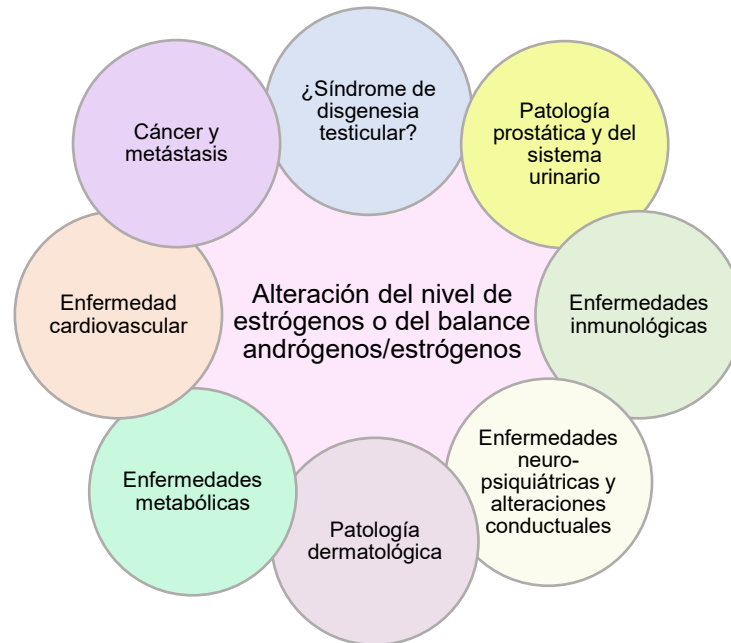
No obstante, pasaron dos décadas hasta que en los años 1970-1980 se demostró la producción de estrógenos en el varón de forma fisiológica en los testículos (7) y otros tejidos (8). En los años 80-90 se emplearon técnicas inmunohistoquímicas para localizar la expresión de aromatasa, enzima clave en la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos (9,10), y del receptor de estrógenos (11). Pero el punto de inflexión en la visión del papel de los estrógenos en el varón llegó con los modelos experimentales en ratones transgénicos, cuando en 1993 se observó que la alteración del gen del receptor de estrógenos provocaba una disminución de la fertilidad (12).

Hoy en día se sabe que el cerebro, el testículo y el pene expresan aromatasa y el receptor de estrógenos y que los estrógenos desempeñan un papel esencial en la regulación de la función reproductiva masculina a



diferentes niveles (13,14).

Los estrógenos también participan en la modulación de otros múltiples procesos en el varón de modo que la alteración del balance andrógenos/estrógenos podría estar implicada en la etiopatogenia de numerosas enfermedades (15,16) como se recoge en la **Figura 1**.



**Fig.1.** *Patologías en las que pueden estar implicados los estrógenos*

En las últimas décadas se ha observado un aumento de la incidencia de las enfermedades hormonodependientes en los países industrializados. Algunos estudios relacionan este incremento con la exposición creciente a agentes químicos ambientales ubicuos, que actuarían como disruptores endocrinos (17,18), aunque sigue siendo una teoría controvertida (19-23).

La terapia hormonal con estrógenos y antiandrógenos lleva empleándose 8 décadas para tratar el cáncer de próstata (24,25), aunque en los últimos años el uso de estrógenos ha disminuido significativamente por los posibles efectos adversos cardiovasculares (24). En la actualidad el tratamiento con estrógenos y antiandrógenos forma parte del proceso de transición de varón

a mujer, por lo que cada vez más personas solicitan recibir terapia hormonal (26), a pesar de los efectos secundarios de los tratamientos (27).

El aumento de la incidencia de las enfermedades hormonodependientes, tales como el cáncer de mama, el cáncer de próstata y el cáncer testicular (17), hace que cada vez sean más útiles las terapias hormonales. Pero aún hay aspectos fisiopatológicos y farmacológicos pendientes de resolver (28). Las biopsias testiculares procedentes de pacientes con cáncer de próstata tratados con estrógenos (29) y las piezas de orquiectomía procedentes de mujeres transgénero sometidas a cirugías de reasignación de género tras haber recibido tratamiento hormonal han sido previamente analizadas con el objetivo de esclarecer el efecto de los estrógenos sobre el testículo humano. Pero los estudios publicados anteriormente en la literatura a este respecto incluyen un número pequeño de pacientes y están mayoritariamente centrados en los efectos sobre el parénquima testicular (30-32).

## **2. Fisiología de los estrógenos**

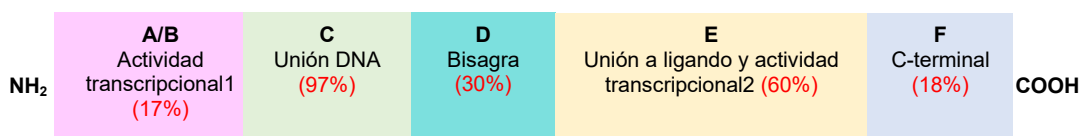
### **2.1. Producción**

El citocromo p450 aromatasa, codificada por el gen denominado CYP19, es la enzima que cataliza la conversión irreversible de andrógenos en estrógenos (33,34) y se encarga de regular el balance entre las dos hormonas. En el ser humano esta enzima está presente en múltiples órganos, pero su expresión es heterogénea y varía según el sexo y el tejido (35,36).

## 2.2. Mecanismos de señalización

Los estrógenos son hormonas esteroideas que se sintetizan en respuesta a la activación de receptores hormonales y a continuación se liberan a la sangre, donde circulan libres o unidos a proteínas transportadoras (19). Las acciones de los estrógenos están mediadas por los receptores estrogénicos. Numerosas células expresan el receptor de estrógenos en el ser humano y en condiciones fisiológicas los estrógenos regulan múltiples procesos (37-40).

Los principales receptores de estrógenos son los denominados clásicos, alfa y beta (41), y el receptor acoplado a proteína G (14). Los receptores de estrógenos alfa y beta pueden coexpresarse en una misma célula y constituir homodímeros o heterodímeros (42). Además, existen isoformas (43). Los receptores estrogénicos clásicos, aunque están codificados por genes distintos, tienen un porcentaje considerable de homología y similar afinidad por el estradiol (ver **Figura 2**).



**Fig.2.** Representación de los dominios estructurales de los receptores de estrógenos clásicos. Se indica el porcentaje de homología entre los dos tipos de receptores entre paréntesis. Modificado de: (41)

No obstante, debido a la existencia de diferencias en el dominio de unión a ligando, los receptores estrogénicos tienen distinta afinidad por otros compuestos estrogénicos (44). Además, en ausencia de estrógenos gran cantidad de señales extracelulares pueden activar el receptor de estrógenos (45).

Existen principalmente dos mecanismos de señalización interconectados: genómico y no genómico. Los estrógenos, por su naturaleza esteroidea, pueden atravesar la membrana plasmática y unirse a receptores intranucleares, directamente o indirectamente a través de la interacción con otras proteínas. El complejo estradiol-receptor a su vez se une a los elementos de respuesta a estrógenos en los promotores génicos. Este es el mecanismo clásico o genómico, que tarda horas. En el mecanismo no genómico las acciones son mediadas por receptores de estrógenos localizados en la membrana o en su proximidad, que están asociados a vías intracelulares, y la señal se transduce en minutos o segundos (14,45-46).

### **2.3. Degradación**

Una vez que han realizado su acción, los estrógenos son conjugados mediante enzimas hepáticas y extrahepáticas para formar productos de degradación fácilmente eliminables por la orina y la bilis (47).

## **3. Papel de los estrógenos en la espermatogénesis**

El testículo en condiciones fisiológicas transforma el 1-2% de la testosterona en estradiol (48) y es responsable de alrededor de un 15 % de los estrógenos circulantes en sangre (36). Pero, aunque en términos globales el estradiol en el hombre proviene mayoritariamente de la conversión de los andrógenos en otros tejidos (49), su concentración en la vena espermática es 50 veces mayor que en la sangre venosa periférica (50). La concentración intratesticular de estradiol es incluso superior a los niveles plasmáticos en la mujer premenopáusica no embarazada (51). Se ha observado que las células testiculares regulan la expresión de aromatasa en modelos animales (52,53).

En el ser humano, las células de Sertoli y las células de Leydig (34) son las principales productoras de estrógenos en el testículo adulto, aunque recientemente se ha demostrado que también las células germinales sintetizan estradiol que contribuye al ambiente hormonal en los tubos seminíferos (13). Además, la aromatasa también se expresa en los conductillos eferentes y en la región proximal del epidídimo (54).

Las acciones de los estrógenos dependen de la concentración hormonal (55,56) y de la célula diana sobre la que actúen (57,58). Estas hormonas en condiciones fisiológicas ejercen efectos en direcciones opuestas (38,59) y regulan múltiples procesos tales como: a) apoptosis y supervivencia, b) proliferación y diferenciación, c) metabolismo, d) dinámica del citoesqueleto, uniones intercelulares y transporte celular, e) acciones de la progesterona y f) eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (14,60-62).

El patrón de expresión del receptor de estrógenos varía según el tipo celular (14,37,63-67) la etapa del desarrollo (68-69) y la fase de la espermatogénesis (37), pero se ha identificado expresión del receptor de estrógenos en todos los tipos celulares del testículo humano (14,37). El desarrollo de la espermatogénesis depende de la correcta comunicación entre las células de los diferentes compartimentos tubular, peritubular e intersticial. Todas las células testiculares son esenciales para el correcto funcionamiento testicular (70).

### **3.1. Apoptosis/supervivencia**

La muerte celular programada es tan importante como la supervivencia de las células germinales, ya que las células dañadas deben eliminarse para evitar la transmisión transgeneracional de anomalías y, además, a través de

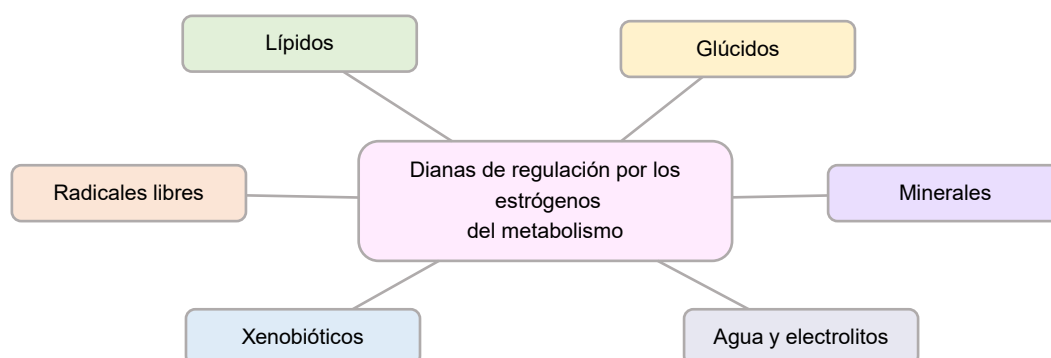
la apoptosis se regula el tamaño de la línea germinal (56). Las concentraciones fisiológicas de estradiol ( $10^{-10}$ - $10^{-9}$  mol/L) inhiben la apoptosis de las células germinales in vitro (55), pero dosis mayores la inducen (56). En modelos animales se ha observado que los estrógenos pueden promover la expresión de proteínas pro-apoptóticas o anti-apoptóticas dependiendo de la concentración hormonal (56) y del receptor de estrógenos al que se unan y en qué célula (56-58,71-73).

### 3.2. Proliferación/diferenciación

Los estrógenos también pueden provocar la diferenciación o la proliferación celular en función del receptor al que se unan y en qué célula. En modelos animales la activación del receptor de estrógenos alfa estimula la proliferación en las células de Sertoli (68), las espermatogonias (74) y las células de Leydig (75), mientras que la activación del receptor de estrógenos beta promueve la diferenciación en las células de Sertoli (68).

### 3.3. Metabolismo

Los estrógenos en condiciones fisiológicas son uno de los factores reguladores del metabolismo (15,62,76) tal como se expresa en la **Figura 3**.



**Fig.3.** Regulación del metabolismo celular por los estrógenos

Los estrógenos regulan el metabolismo de los lípidos. En modelos

animales se ha identificado que la administración de estrógenos disminuye la expresión de StAR en las células de Leydig y en las células de Sertoli (62), una proteína que participa en el traspaso del colesterol al interior de la mitocondria (77). Además, participan en metabolismo de los fosfolípidos. Las células de Sertoli y las células germinales son capaces de sintetizar, transportar y degradar anandamida. Este endocannabinoide regula la progresión meiótica, la espermiación y la capacitación en las células germinales y la apoptosis en las células de Sertoli. La concentración de anandamida está controlada por la hidrolasa amida de ácidos grasos y este enzima a su vez es diana directa del estradiol en modelos animales (78). La administración de di(2-etilhexil) ftalato a ratas prepuberales disminuye la actividad de la fosfolipasa A2 citosólica testicular e induce las enzimas 12-lipooxigenasa y CYP4A1, que reducen los niveles de ácido araquidónico (79). En el ser humano adulto, mono(2-etilhexil) ftalato inhibe la fosfolipasa A2 en plaquetas, por lo que cabe la posibilidad de que los estrógenos asimismo inhiban la fosfolipasa A2 en el testículo adulto (80).

El lactato es la principal fuente energética de las células germinales y en las células de Sertoli el estradiol regula su producción a través de la modificación de la expresión de transportadores de glucosa y enzimas glucolíticas (81). Un adecuado balance de hierro también es esencial para el correcto desarrollo de la espermatogénesis (82,83). En modelos experimentales en animales se ha observado que la administración de estradiol modifica la expresión de genes que participan en el metabolismo férrico en las células de Sertoli, en las células de Leydig, en las espermatogonias y en las espermátidas redondas (62). Asimismo, se ha

identificado que la administración de di(2-etilhexil) ftalato, un disruptor endocrino con efecto antiandrogénico y estrogénico, modifica el metabolismo del zinc (84).

Por otro lado, el fluido luminal aporta nutrientes, hormonas y factores de crecimiento a las células germinales en desarrollo y transporta a los espermatozoides (85). En modelos animales se ha observado que la regulación de la osmolaridad del fluido luminal es necesaria para que los espermatozoides adquieran una adecuada morfología, motilidad y capacidad fertilizante y evitar su activación de forma prematura (86). El epitelio de los conductillos eferentes es responsable de la reabsorción de hasta el 96% del fluido luminal en las ratas (87) y en ratones esta función depende de la integridad del receptor de estrógenos alfa (88). Los hallazgos observados en modelos animales podrían ser extrapolables al ser humano, ya que el epitelio de los conductillos eferentes también expresa el receptor de estrógenos alfa (89). Los estrógenos también regulan el transporte de iones y agua en las células de Sertoli humanas (76). Además, los estrógenos participan en la regulación del metabolismo oxidativo (90,91) y de los xenobióticos (62, 92) tanto en modelos animales como en el ser humano (93).

### **3.4. Citoesqueleto, uniones intercelulares y transporte**

La especialización ectoplásmica apical/basal es un tipo de unión intercelular específica del testículo. Está constituida por la membrana plasmática de la célula de Sertoli adherida a la cabeza de la espermátida, una capa de filamentos de actina y una cisterna de retículo endoplásmico que tiene ancladas proteínas motoras dependientes de microtúbulos. Este tipo de unión



intercelular permite el avance de las espermatidas por el epitelio seminífero (94). En modelos animales se ha identificado que los estrógenos regulan el remodelado del citoesqueleto (62) y los filamentos de actina también forman parte de las uniones intercelulares mediadas por cadherina y las uniones estrechas (95). Además, el estradiol, en conjunto con la hormona foliculoestimulante (FSH), puede modificar la expresión de la cadherina neural, que también media la unión entre las células de Sertoli y las células germinales, en modelos animales (96).

En modelos experimentales los estrógenos también regulan la expresión de proteínas implicadas en el transporte vesicular (62). La endocitosis mediada por clatrina es un proceso necesario para el funcionamiento de los complejos tubulobulbares. Durante la espermiación los complejos tubulobulbares remodelan las uniones intercelulares y las espermatidas se separan del epitelio seminífero. Los complejos tubulobulbares también participan en la eliminación del exceso de citoplasma de las espermatidas y dan forma al acrosoma (97). La administración de estrógenos inhibe la formación de los complejos tubulobulbares en modelos animales (98).

### **3.5. Acciones de la progesterona**

Los estrógenos pueden regular las acciones de la progesterona (99) a través de la modificación de la expresión del receptor de progesterona (60) y de su concentración (100). La progesterona puede inducir la hiperactivación espermática, la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito (101) y la reacción acrosómica (101,102), así como modificar la capacidad de los espermatozoides de fertilizar al ovocito (102).

### 3.6. Eje hipotálamo-hipofisario-gonadal

Los estrógenos disminuyen la frecuencia de la secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y la respuesta hipofisaria a la GnRH (61) y a la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) (103). El estradiol también inhibe la secreción de FSH en hombres sanos (104) y cuando la función tubular se altera significativamente los estrógenos pasan a ser el principal regulador negativo gonadal de la FSH (105). Además, los estrógenos disminuyen la amplitud de la secreción pulsátil espontánea de la hormona luteinizante (LH) (103). Los estrógenos también provocan una retroalimentación negativa sobre la síntesis de andrógenos a través de la inhibición de la  $17\alpha$ -hidroxilasa-17,20-liasa (10). En modelos animales asimismo se ha observado que los estrógenos pueden modificar la expresión del receptor de estrógenos y de andrógenos en la hipófisis y en el testículo (106).

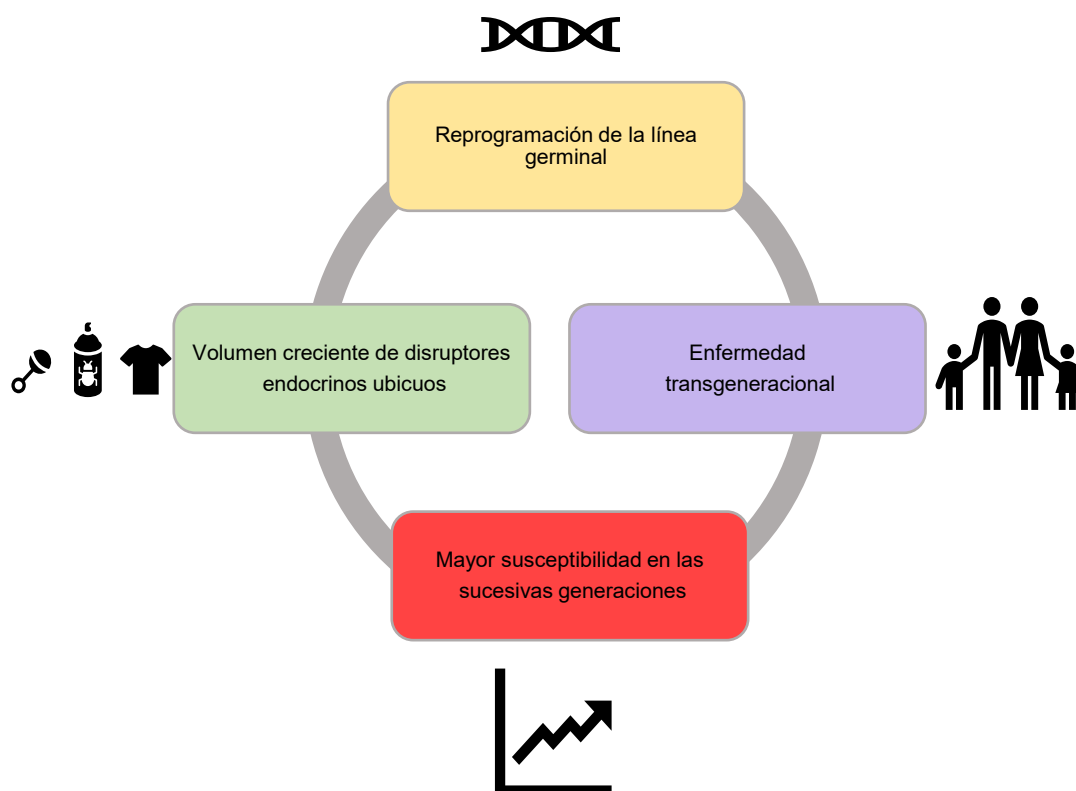
## 4. Disruptores endocrinos

En la actualidad estamos expuestos a cientos e incluso miles de disruptores endocrinos ubicuos a través de múltiples vías (107,108) y su volumen está en continuo aumento (17). Pueden ser naturales, como los fitoestrógenos de la soja, o productos químicos sintéticos utilizados en biocidas, productos de limpieza, cosméticos, envases y pinturas, entre otros usos. Los disruptores endocrinos con propiedades estrogénicas frecuentemente son compuestos químicos lipofílicos, que pueden acumularse en el tejido adiposo y persistir en la cadena alimentaria (107,109). Además, frecuentemente tienen vidas medias largas (109). Algunos de estos

compuestos tienen características estructurales comunes, como el anillo de benceno, que hacen suponer su capacidad de unión al receptor de estrógenos, pero no siempre hay datos estructurales obvios en la molécula que hagan sospecharlo (107,110).

Los disruptores endocrinos imitan a las hormonas de forma imperfecta y modifican las acciones de la hormona endógena. Estos compuestos químicos pueden alterar la síntesis, la liberación, el transporte (19), la unión receptor-ligando (111), la expresión de los receptores hormonales (112), la respuesta intracelular (19) y/o la eliminación hormonal (113). La susceptibilidad genética individual (114), el sexo, la ventana temporal (23,115,116), la duración de la exposición y la dosis (117) influyen en la respuesta celular a los disruptores endocrinos (23), aunque asimismo se han identificado efectos deletéreos a dosis bajas (116,118). Estos compuestos químicos frecuentemente alteran el efecto de más de una hormona (19) y pueden ejercer acciones en direcciones opuestas (119). Además, la enzima sulfotransferasa posee una elevada especificidad de sustrato, por lo que los disruptores endocrinos ambientales podrían poseer una afinidad pobre por este enzima (120).

La exposición a mezclas de compuestos químicos provoca respuestas aditivas (118), sinérgicas y/o antagónicas (121) y altera el epigenoma (118,122-124) y la recombinación genética de los gametos en modelos animales. Además, también se ha observado una mayor vulnerabilidad a la exposición a estrógenos ambientales en las sucesivas generaciones (118) **(Figura 4)**.



**Fig. 4.** Consecuencias evolutivas de la exposición a disruptores endocrinos ambientales

Numerosos estudios en modelos experimentales animales y en el ser humano demuestran que los disruptores endocrinos ejercen efectos tanto a nivel epitelial como estromal y están implicados en el desarrollo de cáncer (17,125-130), alteraciones neuroconductuales (131-132) y de la función reproductiva masculina (133,134) así como en enfermedades metabólicas (135), cardiovasculares (136) e inmunológicas (23,109,137). En el ser humano el efecto de los disruptores hormonales es controvertido pues hay publicaciones que arrojan resultados poco concluyentes (138,139).

## 5. Patologías en las que están implicados los estrógenos

### 5.1. Cáncer y metástasis

La asociación de los estrógenos con el cáncer se detectó tras observarse que las hijas de las mujeres que habían recibido dietilestilbestrol durante el embarazo en los años 1940-1970 eran más propensas a desarrollar adenocarcinoma de células claras de vagina y de cérvix (140,141). En la actualidad asimismo se conoce la participación de los estrógenos y la alteración del balance estrógenos/andrógenos en la carcinogénesis y el proceso metastásico en el pulmón (142), el tracto gastrointestinal (143), la glándula tiroides (144), el cerebro (145), la piel (146), el aparato genital femenino (147), el testículo (148), la próstata (149), el aparato urinario (150) y el sistema hematológico (151). El papel de los estrógenos en el cáncer es complejo y se debe a que en condiciones fisiológicas estas hormonas regulan múltiples procesos potencialmente tumorogénicos (62, 127,143,152-158).

Los estrógenos controlan la proliferación celular. En el cáncer colorrectal estas hormonas estimulan la proliferación celular tras la activación del receptor de estrógenos acoplado a proteína G (143). No obstante, la unión de los estrógenos a otros receptores o determinadas concentraciones hormonales pueden frenar la proliferación y la migración tumoral a través de la inhibición de proteínas que modulan el ciclo celular, como ciclinas (154) y factores de crecimiento (116), o de metaloproteinasas de la matriz extracelular (154).

Estas hormonas también regulan el sistema inmunitario (159). Durante la eliminación de agentes infecciosos y reparación de los tejidos dañados se liberan mediadores inflamatorios que envían señales proliferativas, anti-

apópticas y de activación angiogénica (160). La inducción de un fenotipo proangiogénico en las células endoteliales (153) proporciona nutrientes, oxígeno, factores de crecimiento, hormonas y enzimas proteolíticas que pueden favorecer la expansión tumoral y el proceso metastásico (161).

Los estrógenos asimismo controlan la expresión de microRNAs y estas moléculas a su vez regulan la expresión de numerosos genes involucrados en la proliferación celular, la apoptosis y la angiogénesis (155). Estas hormonas también pueden modificar la expresión de moléculas de unión intercelular y promover la transición epitelio-mesénquima y la migración de las células tumorales (152,162).

En los varones durante el envejecimiento la relación andrógenos/estrógenos disminuye y esta situación hormonal predispone al cáncer de próstata (163). La vía de señalización de los estrógenos puede contribuir al desarrollo de cáncer de próstata a través de varios mecanismos, que incluyen modificaciones epigenéticas y genotoxicidad. La exposición crónica a estrógenos también provoca hiperprolactinemia, que a su vez puede promover la supervivencia y crecimiento de las células tumorales (164). Pero los estrógenos asimismo pueden emplearse para tratar el cáncer de próstata (24,25).

En el cáncer de mama se ha identificado una isoforma del receptor de estrógenos alfa capaz de mediar vías de señalización estrogénicas y antiestrogénicas. Esta variante provoca la resistencia terapéutica o incluso el empeoramiento de la enfermedad tras el tratamiento hormonal de algunos tumores (147).

Numerosos estudios relacionan la exposición a disruptores endocrinos

estrogénicos con el desarrollo de cáncer. La exposición a bisfenol A predispone al carcinoma de mama y de próstata (128,129) y la exposición al dicloro difenil tricloroetano a los tumores de células germinales testiculares (126), al carcinoma de mama (17) y al carcinoma hepatocelular (127,130).

La terapia hormonal cruzada podría predisponer a la aparición de neoplasias (165). El cáncer de testículo está descrito en relación con la administración de estrógenos a mujeres transgénero (148). Los estrógenos y el antiandrógeno acetato de ciproterona se asocian con el desarrollo de prolactinomas (166,167) y meningiomas (168). Además, el cáncer de mama en las mujeres transgénero comienza a una edad más temprana (169) y con mayor frecuencia es triple negativo (170,171). En estas pacientes, el cáncer de próstata generalmente es andrógeno-independiente (172), de peor pronóstico (163), y el empleo previo de fármacos antiandrógenos impide la valoración de la puntuación de Gleason en su gradación (173).

## 5.2. Enfermedades inmunológicas

Los receptores de estrógenos están ampliamente distribuidos en las células inmunitarias (174) y los estrógenos en condiciones fisiológicas ejercen múltiples acciones inmunomoduladoras en neutrófilos, macrófagos (159,175) células dendríticas (159,176) linfocitos (159,176,177), mastocitos, basófilos (176) y eosinófilos (178).

Sus efectos dependen de la concentración hormonal y del receptor al que se unan (174,179). Estas hormonas regulan la maduración de los linfocitos (180,181) y la producción de citoquinas por linfocitos, células dendríticas,

macrófagos (182) y mastocitos (183). Los estrógenos también pueden inhibir o promover la proliferación de linfocitos (182,184), neutrófilos (185), macrófagos (186), mastocitos (187,188) y basófilos (4) y además regulan la apoptosis en los linfocitos (180) y los macrófagos (57). Estas hormonas también pueden modificar la expresión de perforina en las células T reguladoras (189) y ejercen un efecto bifásico sobre su polarización: a bajas concentraciones promueven la diferenciación en Th1 (182), mientras que los niveles elevados favorecen una respuesta inmune mediada por células Th2 (182,190). Además, los estrógenos controlan la expresión de microRNAs, moléculas clave en la regulación del sistema inmunitario (177).

La mayor prevalencia de enfermedades autoinmunes en las mujeres hizo pensar en la participación de los estrógenos en su etiopatogenia (191). Tanto en hombres como en mujeres con lupus eritematoso sistémico se ha identificado una mayor estimulación estrogénica provocada por alteraciones del metabolismo de los estrógenos (192). Además, los niveles elevados de estradiol en sangre predisponen al desarrollo de enfermedad tiroidea autoinmune (193) y esclerodermia. Los niveles elevados de estrógenos en asociación con anticuerpos anti-Scl-70 positivos asimismo empeoran la supervivencia en la esclerodermia (194).

Uno de los mecanismos implicados en la promoción de autoinmunidad por los estrógenos es la inducción de hiperprolactinemia (195). El aumento de los niveles de prolactina provoca la alteración de la tolerancia de las células B y la estimulación de la proliferación de las células inmunitarias, que a su vez liberan citoquinas (196). Los estrógenos también pueden aumentar la expresión de UNC93B1 en modelos animales (197), una proteína esencial en



la señalización del receptor tipo Toll (198), y la expresión de esta proteína está aumentada en las células B de los pacientes con lupus eritematoso sistémico (197). La desregulación de la vía de señalización estrogénica asimismo puede desencadenar reacciones autoinmunes a través del aumento de la expresión de la desaminasa (199), el incremento de los niveles del factor activador de célula B (197) y la reducción de la apoptosis de linfocitos B autorreactivos (180). La alteración de la vía de señalización estrogénica también puede desencadenar respuestas autoinmunes mediadas por células Th1 (200). Por ello, el empleo de fármacos con efecto antiestrogénico se cree que podría ser de utilidad para evitar el rechazo de aloinjerto y en el tratamiento de la enfermedad de Crohn, la diabetes mellitus tipo 1, la esclerodermia y la esclerosis múltiple (201).

Por otro lado, como se ha comentado previamente, los niveles elevados de estrógenos pueden aumentar la actividad de las células presentadoras de antígenos y favorecer una respuesta inmune mediada por células Th2 (182,190), cuya desregulación está implicada en la etiopatogenia de la alergia y el asma (176,178). Los estrógenos también pueden promover el desarrollo de dichas enfermedades a través de la inducción de la degranulación en mastocitos (66) y basófilos y la estimulación de la producción de inmunoglobulina E (176). Por otro lado, la disminución de los niveles de testosterona causada por los estrógenos (2, 202) inclina la balanza hacia la producción de anticuerpos por los linfocitos (203,204) y de citoquinas por los macrófagos (205).

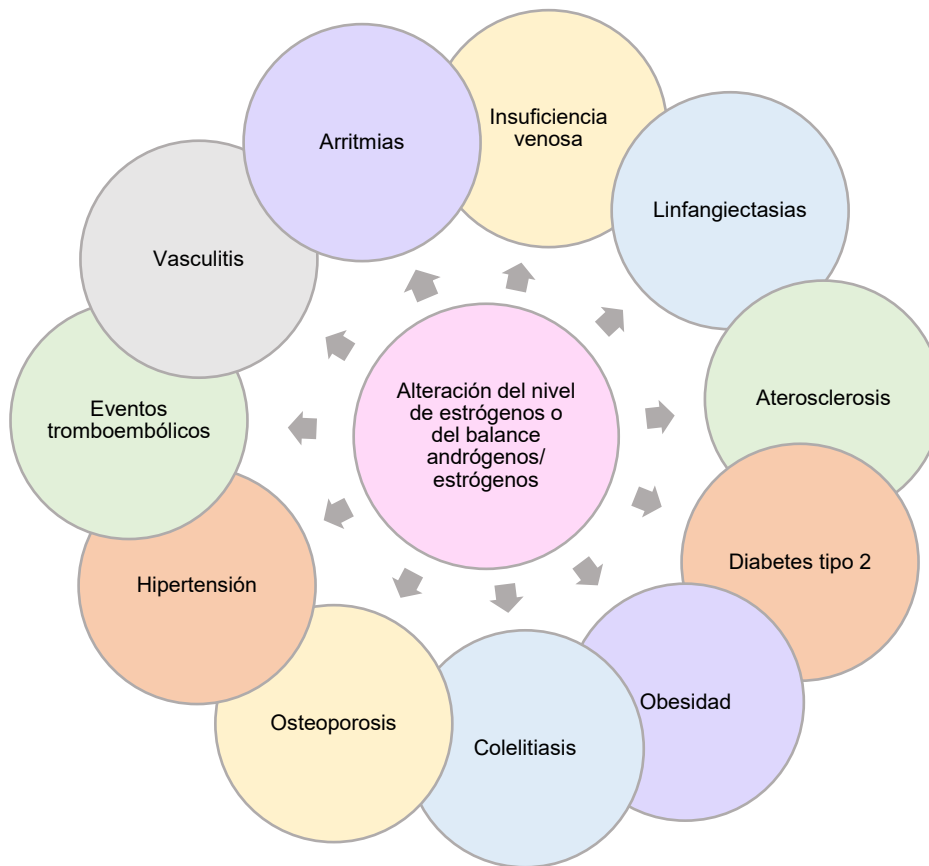
La prevalencia de las enfermedades autoinmunes y de la alergia ha aumentado en las últimas décadas en los países occidentales y numerosas

publicaciones indican que este incremento podría deberse, al menos en parte, a la exposición creciente a xenoestrógenos (23,176). En modelos animales se ha observado que el bisfenol A aumenta la gravedad de la inflamación de los islotes de Langerhans y la incidencia de diabetes tipo 1 en la descendencia (206). La exposición prenatal a este disruptor endocrino también favorece el desarrollo de asma alérgica en modelos animales (115). Además, los estrógenos ambientales aumentan la degranulación de los mastocitos inducida por los estrógenos de forma fisiológica o en respuesta a alérgenos (109). También en el ser humano se ha observado que la exposición al dietilestilbestrol se asocia con un aumento de la inflamación testicular (133).

La administración de anticonceptivos orales asimismo se asocia con el desarrollo de esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, lupus eritematoso sistémico y cistitis intersticial (207). Además, está descrita la aparición de vasculitis en relación con la administración de tamoxifeno (208-210) y el consumo de isoflavonas de soja (211). En mujeres transgénero en tratamiento con estrógenos y antiandrógenos se ha reseñado el desarrollo de esclerodermia (212) y lupus eritematoso sistémico (213,214).

### 5.3. Enfermedades endocrino-metabólicas y cardiovasculares

La integridad de la vía de señalización de los estrógenos es esencial para el mantenimiento de la homeostasis del metabolismo óseo, glicídico y lípidico. En la actualidad se sabe que la alteración en el nivel de los estrógenos y, sobre todo, la alteración del balance andrógenos/estrógenos participan en la etiopatogenia de numerosas enfermedades cardiovasculares (208,215-223) como se recoge en la **Figura 5**.



**Fig.5.** Enfermedades endocrino-metabólicas y cardiovasculares en las que participan los estrógenos y la alteración del balance andrógenos/estrógenos

Los andrógenos y los estrógenos regulan el remodelado óseo y son importantes para el desarrollo y el mantenimiento de la masa ósea en hombres y mujeres (217,224). Además, los estrógenos, también en ambos sexos, son necesarios para la maduración ósea, la mineralización y la adquisición de proporcionalidad esquelética (217). El músculo esquelético también expresa receptores estrogénicos (39) de manera que los estrógenos regulan el crecimiento muscular (225) y participan en las adaptaciones metabólicas durante el ejercicio físico (226).

La disminución de la producción de estrógenos y/o la resistencia estrogénica en hombres adultos provoca alteraciones, como el retraso de la edad ósea, osteopenia y osteoporosis, sin que se vea afectado el crecimiento

óseo lineal (217,227,228). En modelos animales, uno de los mecanismos implicados en el desarrollo de osteoporosis debido a deficiencia estrogénica es la disminución del depósito de colágeno (229). Un exceso de estrógenos también puede favorecer la osteoporosis y la pérdida de masa muscular a través de la disminución del nivel de andrógenos (202,230,231).

Los estrógenos también ejercen acciones en direcciones opuestas sobre el tejido adiposo y regulan la proliferación de los adipocitos y el balance energético (232,233). Estas hormonas inhiben la lipólisis a través de la unión al receptor de estrógenos alfa pero la unión de los estrógenos al receptor de estrógenos beta provoca el efecto opuesto (234).

Los ratones knockout del receptor de estrógenos alfa muestran hiperplasia e hipertrofia del tejido adiposo, a pesar de no observarse cambios en la ingesta de alimentos, y una reducción del gasto energético (235). Por el contrario, tras la administración de estrógenos a ratas se observó un aumento del gasto energético y de la ingesta (4). La deficiencia estrogénica también predispone al desarrollo de obesidad a través de la modificación del microbioma (157). El exceso de estrógenos asimismo disminuye los niveles de andrógenos, lo que promueve el depósito de tejido adiposo (202,231). El déficit de estrógenos también aumenta los niveles de triglicéridos, colesterol total y lipoproteínas de baja densidad y disminuye los niveles de lipoproteínas de alta densidad (217,236). Por otro lado, los estrógenos suprafisiológicos aumentan la absorción hepática de lipoproteínas y disminuyen la síntesis de ácidos biliares (216), favoreciendo el desarrollo de colelitiasis.

Los estrógenos a través de la modificación de la lipólisis y la producción de adipocitoquinas también regulan el metabolismo de la glucosa (237). Se han

identificado polimorfismos de un solo nucleótido del gen ESR1 asociados con la alteración del perfil lipídico, obesidad y diabetes tipo 2 (215,238). Los estrógenos regulan la síntesis de insulina (239), la apoptosis y el metabolismo oxidativo en las células beta pancreáticas (240). Tanto el déficit (217,241) como la resistencia estrogénica elevan los niveles de insulina y alteran la tolerancia a la glucosa (227,235). Pero también se ha observado un aumento del riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 en varones con niveles elevados de estrógenos (242).

En los años 1960-1980 se observó un aumento del riesgo de muerte cardiovascular en pacientes tratados con altas dosis de dietilestilbestrol (243) y este hallazgo alertó sobre las posibles implicaciones patológicas de la alteración de los niveles de estrógenos y del balance andrógenos/estrógenos. Los vasos son estructuras metabólicamente activas que regulan el tono vascular (244-248), la proliferación celular, el depósito de matriz extracelular y la inflamación (249). Las células endoteliales y musculares lisas vasculares expresan aromatasa y receptores de estrógenos, lo que pone de manifiesto el efecto modulador de los estrógenos sobre los vasos (221,250). La conversión de la testosterona en estradiol en condiciones fisiológicas ejerce efectos positivos sobre el sistema vascular (251,252), pero en modelos animales se ha identificado que los estrógenos ejercen acciones en direcciones opuestas sobre la aterosclerosis (253). Los estrógenos pueden prevenir el desarrollo de aterosclerosis tanto en animales (254-257), como en el ser humano (258). Sin embargo, el efecto antiandrogénico de los estrógenos (259) altera negativamente el perfil lipídico (260). Murakami et al (221) han señalado previamente la participación del exceso de estrógenos en el desarrollo de

aterosclerosis en el ser humano. Asimismo, se han identificado mayores niveles plasmáticos de estradiol en pacientes con enfermedad coronaria (261) y los niveles elevados de estrógenos predisponen al desarrollo de enfermedad cardíaca en la esclerodermia (194). También se han observado niveles elevados de estrógenos en pacientes que han sufrido un paro cardíaco súbito (220). Además, el déficit de estrógenos (262) y la resistencia estrogénica también pueden promover la aterosclerosis (263) y el aumento del estrés oxidativo provocado por la deficiencia estrogénica podría estar involucrado en la etiopatogenia de las enfermedades cardiovasculares (264).

La resistencia estrogénica (245) y la deficiencia de estrógenos asimismo inhiben la vasodilatación mediada por flujo (264) y favorecen el desarrollo de hipertensión arterial. La elevación del balance andrógenos/estrógenos en la tercera edad (252) también otorga una mayor susceptibilidad a padecer enfermedad cerebrovascular. Además, se han identificado polimorfismos del gen de la aromatasa asociados con el desarrollo de hipertensión (218) y las variantes de este enzima modifican el riesgo de infarto de miocardio, ictus y muerte en pacientes con enfermedad cardiovascular (265).

Los estrógenos también regulan el tono vascular. La administración de estrógenos a ratas provoca la dilatación de los sinusoides de la glándula suprarrenal y de la hipófisis (4). La mayor prevalencia de enfermedad varicosa venosa en mujeres (266,267) sugiere que los estrógenos participan en el desarrollo de insuficiencia venosa en el ser humano (223) y se ha identificado un balance estrógenos/andrógenos elevado en hombres con venas varicosas (268). Los estrógenos pueden promover la vasodilatación venosa a través del aumento de la expresión de metaloproteasas (269,270). Los estrógenos

también podrían participar en la etiopatogenia de las linfangiectasias, ya que está descrito su desarrollo en mujeres en tratamiento con anticonceptivos orales (222). Además, los estrógenos son protrombóticos incluso a dosis bajas (271).

La exposición a disruptores endocrinos ambientales con efecto estrogénico predispone a la enfermedad cardiovascular. Los niveles elevados de bisfenol A en los niños se asocian con un exceso de adiposidad (272) y la exposición a este disruptor endocrino otorga una mayor susceptibilidad de padecer diabetes tipo 2, hipertensión y dislipemia (135). Además, la exposición al isómero del DDT p,p'-DDT y a bifenilos policlorados predispone a la enfermedad cerebrovascular (136). También se ha observado un aumento del riesgo de desarrollar hipercolesterolemia o hipertensión arterial (273) o de padecer varicocele (274) o enfermedad cardiovascular tras la exposición a dietilestilbestrol (273) y está descrita una asociación entre la exposición a ftalatos y el desarrollo de aterosclerosis subclínica en adultos jóvenes (275).

Las mujeres transgénero en tratamiento hormonal tienen menor masa muscular (231) y pueden presentar tanto un aumento de la densidad mineral ósea (276) como huesos pequeños, osteopenia (231) u osteoporosis (277). También se han identificado niveles elevados de leptina (278) y triglicéridos (27) y una mayor prevalencia de diabetes tipo 2, infarto de miocardio y trombosis venosa (219,277) en las mujeres transgénero en tratamiento hormonal. Hay autores que sugieren el uso de estrógenos transdérmicos para reducir los efectos adversos metabólicos y cardiovasculares en las pacientes transgénero (279), pero otros estudios señalan similares efectos adversos con ambas formulaciones (231,280).

#### **5.4. Enfermedades neuropsiquiátricas y alteraciones conductuales**

Las neuronas y los astrocitos expresan la enzima aromatasa (35,281) y el receptor de estrógenos (282). A nivel de las neuronas, los estrógenos regulan la supervivencia, la diferenciación celular (283) y el metabolismo oxidativo (284). Además, estas hormonas participan en la neuroprotección y en la neuroplasticidad (285) y controlan la expresión de múltiples receptores de neurotransmisores (286,287).

La administración de estrógenos reduce la extensión del daño cerebral en los ictus isquémicos (288), así como la muerte celular (289,290) y la astrogliosis en los traumatismos craneoencefálicos en modelos animales (290). Los estrógenos también retrasan la degeneración cerebral (291) y la menor incidencia de esclerosis lateral amiotrófica en mujeres se piensa que es debido al efecto neuroprotector de los estrógenos sobre las neuronas motoras (292). Además, también se ha observado en modelos animales que los estrógenos regulan la neuroplasticidad en el hipocampo (293,294) y en la corteza prefrontal (295).

Los estrógenos asimismo participan en la regulación de la memoria de trabajo (296), visual (297) y espacial (298). Además, se han identificado polimorfismos de los receptores de estrógenos asociados con diferentes capacidades cognitivas en la mujer (299) y en ambos sexos existe una asociación entre los niveles de estrógenos y el desempeño lingüístico (300). Por otro lado, se ha observado que los estrógenos modulan los ritmos circadianos en modelos animales (301).

En modelos animales el nivel de estrógenos influye en la preferencia sexual (302) y en la actividad sexual (303). En los seres humanos con déficit



de actividad estrogénica no se observan cambios ni en la identidad de género ni en la orientación sexual (217,227,304), pero un adecuado balance andrógenos/estrógenos sí que parece ser importante para la regulación de otros aspectos del comportamiento sexual y la administración de estrógenos a un hombre con déficit de aromatasa aumentó la libido y la frecuencia de actividades sexuales (304). Los estrógenos también regulan la agresividad en modelos animales (305).

Las diferencias existentes entre hombres y mujeres en cuanto a incidencia y progresión de algunas enfermedades neurodegenerativas hicieron pensar en la participación de los estrógenos en su etiopatogenia (306). Los estrógenos ejercen acciones neuroprotectoras (307) y su déficit predispone al desarrollo de enfermedad de Parkinson (308,309). La deficiencia estrogénica también se asocia con el desarrollo de enfermedad de Alzheimer (310,311). Además, se han identificado polimorfismos del receptor de estrógenos (312) y del enzima aromatasa que predisponen a la enfermedad de Alzheimer (313).

Los estrógenos también están involucrados en el desarrollo de enfermedades psiquiátricas. Se ha identificado una menor expresión del receptor de estrógenos alfa a nivel del hipocampo en pacientes esquizofrénicos (314). Así mismo, un polimorfismo del receptor de estrógenos que condiciona una disminución de la señalización estrogénica predispone a padecer esquizofrenia (315). También hay polimorfismos del receptor de estrógenos que asocian un mayor riesgo de padecer depresión (316).

La exposición a bifenilos policlorados se asocia con déficits de memoria y de aprendizaje en modelos animales (287) y aumenta la susceptibilidad a padecer enfermedad de Parkinson (132). La exposición prenatal a bisfenol A

se vincula con el desarrollo de agresividad, hiperactividad (317), ansiedad y depresión (318). Además, la exposición a ftalatos se ha relacionado con un déficit de habilidades sociales (319).

En un estudio en mujeres se observó que la terapia de reemplazo hormonal disminuía el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer cuando se iniciaba en los años más cercanos a la instauración de la menopausia, pero aumentaba el riesgo de padecer la enfermedad si se iniciaba 5 o más años después del inicio de la menopausia (320). La terapia hormonal cruzada administrada a las mujeres transgénero reduce los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro, que participa en la neurogénesis, la maduración neuronal y la sinaptogénesis (321). Además, provoca una disminución del volumen cerebral (322) y la disminución del tamaño del hipocampo podría afectar a la memoria y al procesamiento emocional (323).

La terapia hormonal puede ser útil en algunos casos (308,324-325), pero no hay que olvidar las implicaciones de los estrógenos en el desarrollo de numerosas enfermedades neuropsiquiátricas, previamente señaladas (305,308,312,315, 318,319,326).

### **5.5. Patología dermatológica y del tracto genitourinario**

La piel expresa el enzima aromatasa (327) y receptores de estrógenos (40, 328,329). Se ha identificado que los estrógenos regulan numerosos procesos en la piel y en los anejos cutáneos (330,331), entre ellos la apoptosis (332) y la proliferación (333) de los queratinocitos, en el ser humano y en modelos animales, respectivamente. Los estrógenos también participan en la modulación de la síntesis proteica (334) y en la hidratación de la piel (335) en modelos animales. Además, estas hormonas son inductoras melanogénicas

(336,337) y regulan el ciclo piloso (338) y la actividad de las glándulas sebáceas (339).

La administración de estrógenos aumenta la síntesis de colágeno (334) y de ácido hialurónico y el depósito de agua (335) en el tejido conectivo cutáneo en modelos experimentales en animales. Los estrógenos tópicos aumentan la cantidad de colágeno y mejora la calidad de las fibras elásticas y del colágeno cutáneo en mujeres menopáusicas (340), pero los niveles elevados de estradiol se asocian con una mayor progresión de la enfermedad cutánea en la esclerodermia (194). Además, los parabenos, conservantes frecuentemente presentes en cosméticos y alimentos, interfieren con el metabolismo de los estrógenos (341). El desarrollo de dermatitis alérgica de contacto (342) y de dermatitis sistémica de contacto (343) está descrito en relación con el uso de estos agentes químicos.

En modelos animales se ha observado una desorganización de la queratina en relación con el déficit de estrógenos (230). Por otro lado, la activación del receptor de estrógenos alfa inhibe la transición a la fase de crecimiento piloso en ratones (333). Se han identificado polimorfismos del gen de la aromatasa, que provocan un exceso de estrógenos y predisponen al desarrollo de alopecia de patrón femenino (344). Además, la administración de estrógenos sistémicos provoca una reducción del tamaño y de la actividad secretora de las glándulas sebáceas (339).

En mujeres transgénero la administración de estrógenos reduce el diámetro del tallo piloso (345) y la densidad de pelo (346), pero aumenta su crecimiento en longitud (345). No obstante, el tratamiento con estrógenos y antiandrógenos favorece el crecimiento del pelo en mujeres transgénero con

patrón de pérdida de cabello masculino (347). El tratamiento con estrógenos y antiandrógenos también reduce la producción de sebo (345).

La enzima aromatasa y los receptores de estrógenos también se expresan en la próstata (348), en las vesículas seminales (349,350), en la vejiga (349,351) y en el riñón (35, 352). La administración de estrógenos a animales aumenta el peso de la próstata (3) y altera el peso de las vesículas seminales (3-5). Además, los estrógenos regulan la proliferación/diferenciación de las células prostáticas e induce metaplasia escamosa (353,354) e hiperplasia de células basales (354). La alteración de la vía de señalización estrogénica asimismo participa en el desarrollo de la hiperplasia de próstata (355,356) y el adenocarcinoma de próstata (348, 357). Los estrógenos también pueden modificar la población de bacterias que alberga el tracto reproductivo masculino y la prostatitis crónica por *Propionibacterium acnes* se ha relacionado con el adenocarcinoma de próstata (157,358).

Los estrógenos regulan la expresión de múltiples genes a nivel de la vejiga (351) y se ha identificado una elevada expresión de aromatasa en el cáncer de vejiga (150). La expresión vesical del receptor de estrógenos alfa está aumentada en la obstrucción infravesical en relación con la hiperplasia de la pared vesical (359). Además, el uso de anticonceptivos orales aumenta el riesgo de desarrollar cistitis intersticial (207).

En modelos experimentales se ha observado que los estrógenos regulan el crecimiento renal (360) y ejercen efectos nefroprotectores. Estas hormonas retrasan el envejecimiento renal (361). La administración de estrógenos tras una parada cardíaca asimismo mitiga las lesiones provocadas por la insuficiencia renal aguda (362) y en modelos experimentales disminuye la

excreción urinaria de proteínas (4). No obstante, la vía de señalización de los estrógenos participa en las nefropatías inmunomediadas (352).

### **5.6. Síndrome de disgenesia testicular**

Está descrito el empeoramiento de la calidad del espermatozoides en los países industrializados en las últimas décadas (363-366), y un aumento de la incidencia de criptorquidia (367), hipospadias (368) y cáncer testicular (369-370). El concepto de síndrome de disgenesia testicular nació tras detectarse que estas entidades se asociaban y eran factores de riesgo entre ellas. Skakkebaek et al propusieron que estas enfermedades eran síntomas de una misma enfermedad, más o menos grave, que englobaron bajo el nombre de síndrome de disgenesia testicular (371).

La criptorquidia es la malformación congénita masculina más frecuente de los genitales externos (372) y el hipospadias la del pene (373). Un testículo se considera no descendido o criptorquídeo cuando en vez de localizarse en la base del escroto está en la ingle o dentro de la cavidad abdominal (374). El hipospadias consiste en la apertura ventral de la uretra por un fallo en su correcto cierre (375). Además, más del 90% de todos los tumores testiculares derivan de células germinales (376) y este grupo de neoplasias malignas son el tipo más frecuente en varones adolescentes y adultos jóvenes en los países industrializados (370). Los avances conseguidos en la terapia multimodal han disminuido la mortalidad, pero los tratamientos que reciben estos pacientes son una causa importante de morbilidad y la mayor tasa de supervivencia podría aumentar la incidencia de segundos tumores primarios (377).

El síndrome de disgenesia testicular se debe a múltiples causas. Las

causas más severas son generalmente genéticas (378-380), pero el aumento tan significativo de su incidencia en las últimas décadas no puede ser explicado exclusivamente por factores genéticos. El hecho de que el riesgo de cáncer testicular en la primera generación de inmigrantes sea análogo a la de sus países de origen, pero el riesgo de la segunda generación sea similar al del país donde han migrado (381), indica el papel tan importante que desempeñan los factores ambientales en su etiopatogenia (114,384).

Las células de la neoplasia de células germinales in situ expresan marcadores similares a las células germinales primordiales (385). Por ello, hay autores que sostienen que el síndrome de disgenesia testicular se origina en la etapa fetal (386,387). La hipótesis estrogénica propone que la exposición fetal o neonatal a estrógenos participa en la etiopatogenia del síndrome de disgenesia testicular (388). Los estrógenos disminuyen el nivel de andrógenos (202) y el descenso del testículo y la formación de la uretra peneana dependen de la correcta acción de los andrógenos en las semanas 8-14 de gestación (389). Desde los años 80 se sabe que los estrógenos no sólo afectan a las células de Sertoli durante una etapa temprana del desarrollo, sino que también pueden provocar la desdiferenciación de las células de Sertoli adultas (30,31). La implicación de los estrógenos en el síndrome de disgenesia testicular a día de hoy sigue siendo una teoría controvertida (390), especialmente en el adulto (19).

No obstante, hay estudios que apoyan la participación de los estrógenos en el síndrome de disgenesia testicular. Los estrógenos regulan negativamente el factor similar a insulina 3 (391), esencial para un correcto descenso del testículo (392). Los niveles de esta proteína están

disminuidos en recién nacidos con criptorquidia idiopática (393) y se han identificado niveles elevados de estrógenos en sangre durante el primer trimestre en madres de niños con testículos no descendidos (394). Los niveles elevados de estrógenos también pueden provocar la atrofia del gubernaculum (395) prevenir la regresión del ligamento craneal gonadal (396) e inhibir los efectos de la hormona antimülleriana (397). Pero asimismo se ha observado el desarrollo de criptorquidia en relación con un déficit de estrógenos (262). Los fibroblastos procedentes de pacientes con hipospadias producen niveles elevados de estrógenos (398) y se ha observado la sobreexpresión del factor de transcripción dependiente de AMPc 3, que responde a estrógenos (399), en el tejido conjuntivo de pacientes con hipospadias (400).

La correcta producción de estrógenos es esencial para la fertilidad y tanto el déficit (401,402) como el aumento de los estrógenos (29,32,186,403), provocan infertilidad. En modelos experimentales en animales, tras la administración de estrógenos se ha observado una pérdida de la luz tubular, la alteración de la espermatogénesis (404) y se ha objetivado la participación de los estrógenos en la etiopatogenia de la disfunción eréctil (5,405). La disminución de los niveles de testosterona provocada por los estrógenos (2,202) y la ratio de testosterona/estradiol inferior a 10 (406,407) también contribuyen al empeoramiento de la fertilidad (408,409).

La resistencia estrogénica también provoca infertilidad (227) y uno de cada tres casos de infertilidad masculina se debe al varicocele, entidad en la que la expresión de receptores de estrógenos en los espermatozoides está muy disminuida (410). Se han identificado asimismo polimorfismos de los receptores de estrógenos asociados con un mayor riesgo de azoospermia

(411). Por otro lado, la administración de estrógenos promueve la proliferación tumoral a través del aumento de la expresión del receptor de estrógenos acoplado a proteína G y la disminución de la expresión del receptor de estrógenos beta (412).

En el síndrome de disgenesia testicular los testículos frecuentemente son atróficos (413-415) y muestran túbulos seminíferos de diámetro reducido (413,416). Además, pueden observarse túbulos disgenéticos, aislados o agregados constituyendo nódulos de células de Sertoli, revestidos por células de Sertoli inmaduras que muestran pseudoestratificación de núcleos esféricos u ovales, de contorno liso en vez de hendido y con nucleolos inconspicuos o pequeños (414,415, 417).

Con el uso de técnicas inmunohistoquímicas se ha confirmado el fallo de la maduración de las células de Sertoli en el síndrome de disgenesia testicular (415, 418-422). Las células de Sertoli inmaduras no pueden ofrecer el apoyo físico y metabólico necesario para el desarrollo de las células germinales (385). Por ello, los pacientes presentan diferentes grados de alteración de la espermatogénesis (414,415,423) y ocasionalmente las células germinales indiferenciadas se transforman y originan una neoplasia de células germinales in situ (385).

Otros hallazgos histopatológicos frecuentemente observados en el síndrome de disgenesia testicular son la hialinización tubular (415) y el engrosamiento de la membrana basal (413,414,416,424). Además, pueden identificarse células de Leydig intratubulares (425) y a nivel intersticial, frecuentemente se observa hiperplasia de células de Leydig inmaduras (413,414,416,426-428). En las vías espermáticas puede observarse

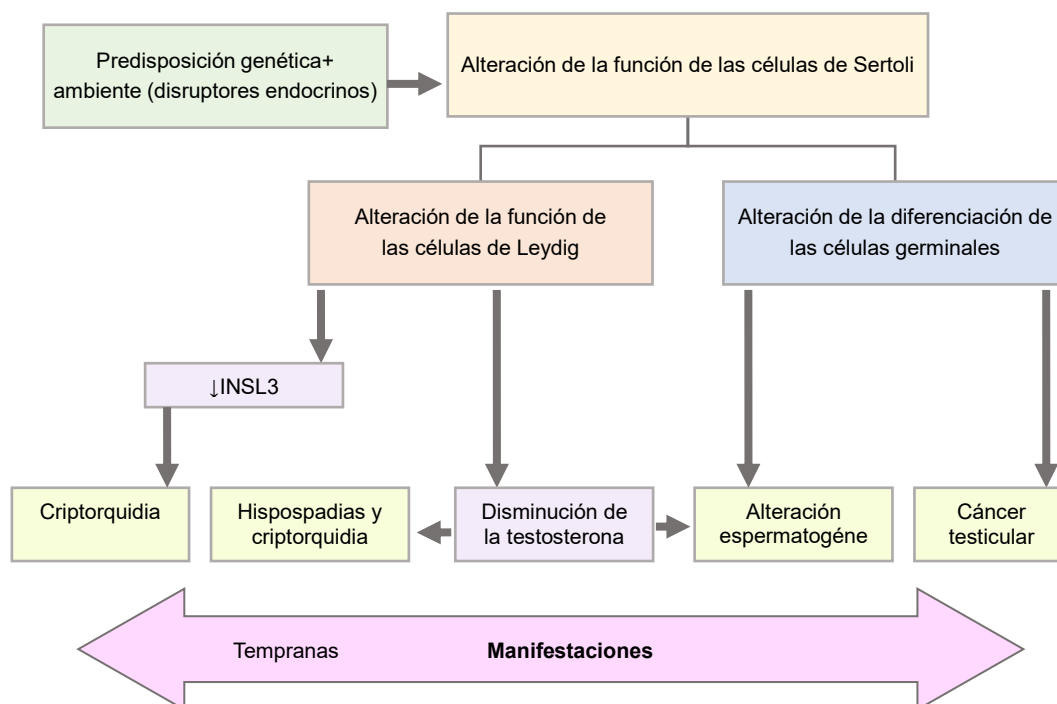


hiperplasia adenomatosa de la rete testis (415, 429) y atrofia del epidídimo (430).

En un modelo animal se evaluaron los efectos de la exposición a ftalatos sobre el testículo, agentes químicos con efecto antiandrogénico (431) y débilmente estrogénico (107) y se identificaron las mismas lesiones histológicas que se observan en el síndrome de disgenesia testicular (432). Numerosas publicaciones señalan la implicación de los disruptores endocrinos ambientales en la etiopatogenia del síndrome de disgenesia testicular (17,118,125,134,393,433-435). Se han identificado niveles elevados de bisfenol A en embarazadas (17) y en recién nacidos con hipospadias (433). Además, los niveles de bisfenol A se correlacionan de forma inversa con los del factor similar a insulina tipo 3, el cual es primordial para el correcto descenso testicular (393). Por otro lado, la exposición a ftalatos se relaciona con la agenesia del gubernaculum (434).

En las madres con hijos con cáncer testicular se ha identificado una mayor concentración de xenoestrógenos (125). Además, se ha observado una disminución de la producción de espermatozoides en relación con la exposición a agentes químicos ambientales (118,134,435,436). La exposición a bisfenol A provoca la desintegración de la barrera hematotesticular en modelos animales (437). Además, la exposición a ftalatos se relaciona con la atrofia testicular y epididimaria (434,438). La exposición de animales a ftalatos (439), o a otros compuestos con actividad estrogénica y antiandrogénica (440), asimismo altera la proliferación de las células de Leydig. La exposición prenatal al dietilestilbestrol, un estrógeno sintético, provoca hiperplasia del epitelio de la rete testis en ratones (441). El dietilestilbestrol es capaz de alterar el desarrollo

del tracto genital masculino (133, 397) y la exposición de animales a ftalatos durante el período fetal y neonatal altera el desarrollo del epidídimo (442). No obstante, algunos estudios no han identificado efectos deletéreos tras la exposición a disruptores endocrinos estrogénicos (20,21,443). En la actualidad el síndrome de disgenesia testicular se considera una enfermedad multifactorial (371,379,444-447), tal como se recoge en la **Figura 6**.



**Fig. 6.** Etiopatogenia del síndrome de disgenesia testicular. Modificado de: (371)

## 6. Terapia hormonal cruzada

En la actualidad la terapia hormonal cruzada a largo plazo es el pilar fundamental del tratamiento hormonal en las mujeres transgénero (26). El objetivo principal de la terapia hormonal es conseguir los niveles hormonales y los caracteres sexuales secundarios del género con el que el individuo se siente identificado y reducir los del género original. Para ello, en las mujeres transgénero se administran estrógenos. Además, se pueden añadir fármacos antiandrogénicos o análogos de GnRH en combinación con los estrógenos

(448), aunque su uso es controvertido y hay autores que consideran que añaden relativamente poco al efecto antiandrogénico de los estrógenos (259). El acetato de ciproterona es una hormona esteroidea sintética que inhibe la síntesis de testosterona en las células de Leydig (449) y los análogos de GnRH disminuyen la producción de testosterona cuando se administran de forma crónica a través de la inhibición de los receptores de GnRH (450).

Los tipos de estrógenos y las dosis empleadas han cambiado a lo largo del tiempo. Hoy en día se desaconseja el uso de estrógenos sintéticos o de estrógenos conjugados, porque estos fármacos asociaban un elevado riesgo cardiovascular (26,451,452) y no era posible el análisis del nivel hormonal para el ajuste de dosis (448). El uso combinado de antiandrógenos con estrógenos transdérmicos o dosis bajas de estradiol oral actualmente se considera más seguro (448,451,453,454). En la Tabla 1 se recogen los regímenes hormonales actualmente recomendados en mujeres transgénero.

**Tabla 1.** Regímenes hormonales recomendados en las mujeres transgénero. Modificado de:(448)

Terapia hormonal cruzada: Estrógenos ± antiandrógenos o agonistas de GnRH	
Estrógenos	
Estradiol oral	2,0-6,0 mg/día
Parche transdérmico de estradiol (cambiar a los 3-5 días)	0,025-0,2 mg/día
Valerato o cipionato de estradiol parenteral	5-30 mg intramuscular cada 2 semanas 2-10 mg intramuscular cada semana
Antianandrógenos	
Espironolactona	100-300 mg/día
Acetato de ciproterona	25-50 mg/día
Agonistas de la GnRH	
3,75 mg (inyección subcutánea) mensualmente + 11,25 mg (inyección subcutánea) cada 3 meses	

Uno de los principales problemas en este grupo de pacientes es la automedicación. Con la idea errónea de que mayores dosis darán mejores resultados en menor tiempo, un número significativo de mujeres transgénero se automedica, aumentando los efectos adversos (166,455).

### 6.1. Estudio histológico del testículo en individuos transgénero de varón a mujer

Las piezas de orquiectomía bilateral procedentes de la cirugía de reasignación de género han sido estudiadas con anterioridad para analizar el efecto de los estrógenos exógenos sobre las células humanas, pero la mayoría de las publicaciones se han centrado mayoritariamente en el estudio del parénquima testicular (30,456). Sapino et al (457) observaron testículos atróficos de pequeño tamaño. Además, Shulze (30) describió diferentes morfologías nucleares en las células de Sertoli tras la terapia hormonal cruzada. Nistal et al (31) asimismo observaron diferentes grados de

desdiferenciación nuclear en las células de Sertoli y definieron 3 patrones madurativos (adulto, puberal e infantil). Además, confirmaron la desdiferenciación morfológica en respuesta a la terapia hormonal cruzada con el uso de técnicas inmunohistoquímicas. Otros hallazgos histopatológicos frecuentemente observados son la alteración de la espermatogénesis (30-32,456,457), la hialinización de la pared tubular (30-32) y, a nivel intersticial, el aumento (457) o la disminución (31) de células de Leydig desdiferenciadas (30,32,456). Además, Nistal et al (31) compararon la respuesta histopatológica testicular de piezas de orquiectomía bilateral procedentes de mujeres transgénero que habían recibido terapia hormonal cruzada previamente con los hallazgos de biopsias testiculares procedentes de pacientes criptorquídicos adultos y observaron lesiones semejantes. El análisis de los efectos de la terapia hormonal cruzada se ha centrado en las acciones sobre el parénquima testicular y el impacto sobre la vía espermática, las estructuras vasculares y las células inflamatorias testiculares ha sido estudiado en mucha menor medida (457).

## ***HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

## **Hipótesis**

Con las premisas anteriores, que sugieren que las células de Sertoli adultas se desdiferencian en respuesta a la exposición prolongada a estrógenos y antiandrógenos y para poder entender mejor las enfermedades en las que están implicados los estrógenos, planteamos las siguientes hipótesis de trabajo:

- El tratamiento con estrógenos y antiandrógenos a largo plazo provoca marcadas alteraciones no solo en las células de Sertoli, sino también en otras estructuras y tipos celulares del parénquima testicular y en la vía espermática
- ¿Se puede confirmar que existe paralelismo entre las lesiones testiculares producidas por el tratamiento con estrógenos y antiandrógenos a largo plazo y las descritas en el síndrome de disgenesia testicular?

## **Objetivos**

Para intentar demostrar la hipótesis, los objetivos específicos de esta tesis fueron:

**Objetivo primero.** Evaluar los cambios morfológicos, cualitativos y cuantitativos, en las células del parénquima testicular, la albugínea, las estructuras vasculares testiculares y en la vía espermática en piezas de orquiectomía procedentes de cirugías de reasignación de género realizadas en individuos adultos que recibieron tratamiento prolongado con estrógenos y antiandrógenos.

**Objetivo segundo.** Determinar cambios funcionales en el parénquima testicular, la albugínea y la vía espermática a través del estudio de la expresión inmunohistoquímica de inhibina, calretinina, D2-40, CK8/18/19, actina, colágeno IV, CD34, CD68, triptasa y de receptores de andrógenos, estrógenos y progesterona, en piezas de orquiectomía por reasignación de género de individuos sometidos a tratamientos hormonales prolongados.

**Objetivo tercero.** Establecer si existe relación entre los hallazgos encontrados en piezas de orquiectomía por reasignación de género de individuos con tratamiento con estrógenos y antiandrógenos a largo plazo y los descritos en la disgenesia testicular.



## ***MATERIAL Y MÉTODOS***

## 1. MATERIAL

En la presente tesis doctoral se han estudiado 84 piezas quirúrgicas de orquiectomía bilateral, procedentes de 42 pacientes, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz.

Las características de la población del estudio se resumen en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Resumen de las características de la población del estudio

Tamaño muestral	84 piezas de orquiectomía bilateral (42 pacientes)
Datos clínicos	Cirugía de reasignación de género Terapia hormonal cruzada a largo plazo
Año de la cirugía	2009-2019
Institución	Hospital Universitario La Paz
Servicio	Anatomía Patológica
Media de edad (y rango)	34 años (22-62)

## 2. MÉTODOS

### 2.1. Fijación del tejido testicular

La mayoría (78) de las piezas de orquiectomía se fijaron exclusivamente por inmersión en formol.

La mitad de 6 piezas de orquiectomía se fijaron en Bouin.

### 2.2. Tallado, secciones con microtomo y tinciones histológicas

Las piezas de orquiectomía fueron seccionadas perpendicularmente al eje mayor del testículo, realizándose cortes con un espesor de aproximadamente 3 mm.

A continuación, se procedió a la inclusión de la muestra tisular en parafina en el procesador de tejidos, lo que permitió realizar la deshidratación de las secciones fijadas mediante dos pases consecutivos, de una hora cada uno, en alcohol de concentraciones crecientes (70%, 96% y alcohol absoluto) y aclarado posterior en xilol. Finalmente, las secciones tisulares se incluyeron en parafina líquida (punto de fusión 60°C) durante dos horas.

Una vez realizados los bloques de parafina, se obtuvieron cortes de 5 µm de espesor, mediante un micrótomos.

Las secciones se desparafinaron en xilol y se tiñeron con las técnicas de Hematoxilina-Eosina-Harris y Orceína, siguiendo los métodos histológicos habituales (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Resumen de los métodos de fijación, tinciones histológicas y métodos de montaje empleado

<b>Fijación en formol-sal,</b> años: 2009-2013 (38 piezas de orquiectomía)	Formol al 10% (formaldehído comercial VWR al 4% diluido con H <sub>2</sub> O) Por cada 20L de formol diluido se añadían 224g de NaCl
<b>Fijación en formol,</b> años: 2014-2019 (46 piezas de orquiectomía)	Formol comercial al 4%
<b>Fijación en formol y Bouin</b> (6 piezas de orquiectomía)	750 ml de ácido pícrico a saturación en agua destilada, 250 ml de formol puro al 40% y 50 ml de ácido acético glacial
<b>Procesador de tejido</b>	Leica ASP300 S
<b>Micrótomos</b>	Leica RM 2155 y Microm HM330
<b>Tinciones</b>	Técnicas: Hematoxilina-Eosina-Harris y Orceína Multi Teñido automático robotizado: Leica ST5020
<b>Métodos de montaje para las técnicas histológicas</b>	Montador automático de cubreobjetos: Leica CV5030 Resina sintética DePex (Probus, Badalona)

## 2.3. Tinciones inmunohistoquímicas

Las técnicas inmunohistoquímicas se realizaron en la plataforma automática DAKO OMNIS y se empleó el sistema de visualización DakoEnVision®.

Los anticuerpos utilizados y su casa comercial y dilución se resumen en la

**Tabla 4.**

**Tabla 4.** Resumen de los anticuerpos utilizados

Anticuerpos	Casa	Dilución
Anti-CD68 KP1	Dako	Prediluido
Anti-CD34	Dako	Prediluido
AML A1A4	Dako	Prediluido
Anti-triptasa	Dako	Prediluido
Anti-inhibina $\alpha$	Dako	Prediluido
Anti-calretinina	Dako	Prediluido
Anti-receptor de andrógenos	Dako	Concentrado (1/100)
Anti-receptor de estrógenos $\alpha$	Dako	Prediluido
Anti-receptor de progesterona	Novocastra	Prediluido
Anti-D2-40	Dako	Prediluido
Anti-CK8/18/19	Dako	Concentrado (1/50)
Anti-colágeno IV	Dako	Concentrado (1/100)

## 2.4. Estudio macroscópico

Se consultó en los **informes anatomopatológicos**:

**Tamaño** (cm) de las piezas de orquiectomía.

Se calculó el volumen testicular (ml) tras fijación usando la siguiente fórmula:  $(\pi La^2)/6$ , en la que L es longitud y a anchura (458).

## 2.5. Estudio de la respuesta histopatológica al tratamiento

- Para la valoración de las variables histopatológicas cuando se indica y de los marcadores inmunohistoquímicos se empleó la siguiente escala:
  - Ausente (A), Focal (F): $\leq 10\%$ , Parcheado (P): $11\%-75\%$  o Difuso (D): $\geq 75\%$  Esta escala se señalará en lo sucesivo como AFPD.
- En el resto de variables cualitativas sólo se especificó si la característica estaba presente o ausente.
- Para la toma de medidas se usó el programa Labsens.
- Los decimales de las variables cuantitativas se redondearon hacia arriba cuando el siguiente número fue mayor de 5.
- Se registraron por separado los hallazgos de los testículos derecho e izquierdo, para poder valorar la simetría, aunque cada paciente se valoró en conjunto.
- Para el estudio histopatológico se usaron dos microscopios ópticos de la marca Olympus: modelos **BX43F** y **BX51TF**
- Para comparar los hallazgos de las variables cuantitativas con **valores normales se tomaron como referencia los publicados previamente** (459).

En el estudio histopatológico del parénquima testicular y de las vías espermáticas se consideraron las variables que se detallan a continuación.

## 2.5.1. Estudio histopatológico del parénquima testicular

### Tubos seminíferos

- **Diámetro tubular medio** ( $\mu\text{m}$ ), sin incluir la túnica propia, en secciones tubulares transversales de 20 tubos seminíferos representativos en cada testículo (40 tubos seminíferos por paciente)
- **Espacio intersticial intertubular**, medido en 20 campos representativos ( $\mu\text{m}$ ) en cada testículo (40 campos por paciente)
- **Luz tubular**
  - Dilatación
  - Pérdida (AFPD)
- **Tubos hipoplásicos** (AFPD)
  - Aislados
  - Agregados
    - Zonas hipoplásicas: 3-4 tubos hipoplásicos agregados
    - Nódulos de Sertoli: 5 o más tubos hipoplásicos agregados
- **Tubos en anillos con microcalcificación**
- **Células de Sertoli**
  - Citoplasma: Atrofia (AFPD), vacuolas, cambio eosinófilo granular.
  - Núcleo: Pseudoestratificación (AFPD)
    - Elongado, redondeado o triangular y carioteca lisa o irregular
    - Nucleolo: ausente, inconspicuo periférico (único o múltiple), visible central o prominente central

- **Tubulitis** aguda y/o crónica (AFPD)
- Presencia/ausencia de **macrófagos intratubulares**
- **Células germinales**
  - **Tipo de células germinales** presentes (AFPD)
  - **Ausentes: tubos con sólo células de Sertoli** (AFPD)
  - **Espermatogonias**: alejadas de la membrana basal, hipertróficas, citoplasma vacuolado, multinucleadas y/o núcleo irregular
  - **Espermatocitos I**: Descamación y/o megaloespermatocitos
  - **Espermátidas redondas** multinucleadas
  - Testículos con **espermatogénesis completa y difusa: conteo de células germinales** en 20 tubos seminíferos cortados transversalmente
  - **Apoptosis**
- **Pared tubular**
  - **Espesor de la túnica propia** ( $\mu\text{m}$ ) en 20 tubos representativos / testículo. Se registró el espesor de:
    - Membrana basal, hialinización, capa de células mioideas peritubulares
- **Hialinización tubular** (AFPD)

### Intersticio

- **Células de Leydig**
  - **Distribución**: irregular, septos interlobulillares, peritubulares, pared y/o intratubulares
  - **Tamaño**
    - Involutivas y/o hipertróficas

- **Citoplasma**
  - Vacuolización periférica y/o lipofucsina
- **Núcleo**
  - Multinucleación, contorno irregular, nucléolo y/o hipercromasia
- **Extraparenquimatosas**
  - Epidídimo, albugínea y/o cordón espermático
- **Infiltrados linfoides intersticiales** (AFPD)
- **Hemosiderófagos** (presentes / ausentes)

## 2.5.2. Estudio histopatológico de las vías espermáticas

### Rete testis

- **Atrofia, hiperplasia** adenomatosa, **colapso** y/o **dilatación**
- **Metaplasia** cúbica y/o **vacuolización** de las células epiteliales

### Características generales de conductillos eferentes y conducto epididimario

- **Diámetro** ( $\mu\text{m}$ ) de 5 secciones transversales del cuerpo del epidídimo y de los conductillos eferentes representativas (pared muscular incluida).
  - **Atrofia** y/o **dilatación**
- **Infiltrados inflamatorios** y/o **macrófagos** en la luz
- **Quiste** de restos embrionarios
- **Tejido ectópico** suprarrenal



### **Epitelio de los conductillos eferentes**

- Pérdida del **festoneado interno**
- **Citoplasma**: vacuolización, aumento de lipofucsina y/o anfófilo

### **Conducto epididimario**

- Pérdida del **patrón cribiforme y/o estereocilios**
- **Vacuolización de células principales**
- **Hiperplasia y/o atrofia de células basales**
- **Secreción luminal calcificada y/o microlitiasis**

### **2.5.3. Túnica vaginal**

- **Metaplasia** cúbica y/o urotelial y/o **vacuolización** del mesotelio
- **Calcificación** en el tejido conjuntivo submesotelial
- **Infiltrados linfoides**: células aisladas o agregadas

### **2.5.4. Estudio histopatológico de las estructuras vasculares**

- **Arterias**
  - **Hialinosis arteriolar**: severa o no y/o con/sin depósito de calcio
  - **Aterosclerosis**
  - **Vasculitis**
- **Venas**
  - **Fibrosis de la pared o ectasia**
  - **Infiltrado linfocítico perivenular**

- **Linfangiectasias**

### **2.5.5. Estudio histopatológico de la albugínea**

- **Espesor**, en una zona alejada del mediastino y del epidídimo ( $\mu\text{m}$ )
- **Tubos seminíferos ectópicos**

## **2.6. Estudio inmunohistoquímico**

Se realizó en un bloque de parafina de uno de los dos testículos de cada pieza de orquiectomía bilateral.

Las células o estructuras y criterios que se valoraron con cada uno de los anticuerpos utilizados se detallan a continuación.

**D2-40**: Células de **Sertoli**

**CK8/18/19**: Células de **Sertoli**

### **Inhibina**

- Tubo seminífero: Células de **Sertoli**
- Intersticio: Células de **Leydig**

**Colágeno IV**: **Pared** tubular

**Orceína**: **Pared** tubular

### **Actina**

- **Pared de los tubos seminíferos**
  - **Patrón de tinción**: Normal, hojaldrada, 2 capas y/o 1 capa
  - **Perdida con interrupción** de la expresión **continua** peritubular

- **Albugínea: Pérdida** de expresión en los **miofibroblastos**

**CD34:** Pared tubular

**Calretinina**

- **Células de Sertoli**

**Contaje de células de Leydig** (se fotografiaron 10 campos a 20X)

- N° de células de **Leydig intersticiales** totales (sueltas+agrupadas)  
/ n° total de tubos seminíferos
- N° de células de **Leydig peritubulares**/ n° total de tubos seminíferos
  - 1 tubo = 1 corte tubular transversal
  - En cortes perpendiculares se realizó una aproximación

- **Presencia/ausencia de células de Leydig intratubulares**

**CD68**

- **Contaje de macrófagos** del parénquima testicular (se fotografiaron 20 campos a 20X)
  - N° de macrófagos **intersticiales** totales / n° de tubos totales
  - N° de macrófagos **peritubulares** totales / n° de tubos totales
    - 1 tubo = 1 corte tubular transversal
    - En cortes perpendiculares se realizó una aproximación
- **Presencia/ausencia de macrófagos intratubulares**

**Triptasa**

- **Contaje de mastocitos** del parénquima testicular (se fotografiaron 20 campos a 20X)
  - N° de mastocitos **intersticiales** totales / n° de tubos totales
  - N° de mastocitos **peritubulares** totales / n° de tubos totales
    - 1 tubo= 1 corte tubular transversal
    - En cortes perpendiculares se realizó una aproximación
- Presencia/ausencia de **mastocitos intratubulares**

#### Receptores de estrógenos en la vía espermática

- Epitelio de la **rete testis, conductillos eferentes y conducto epididimario**

#### Receptores de andrógenos y de progesterona

- **Parénquima testicular**
  - Tubos seminíferos: células de **Sertoli** y células **peritubulares**
  - Intersticio: células de **Leydig** y células estromales **CD34+**
- **Vías espermáticas**
  - Epitelio: **rete testis, conductillos eferentes y conducto epididimario**
  - **Pared muscular** del **epidídimo**

En la **Tabla 5** se resumen en qué células se ha valorado la expresión inmunohistoquímica de cada uno de los marcadores.

**Tabla 5.** Resumen de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos y estructuras o células valoradas

	D2-40	CK8 /18 /19	Calretinina	Col. IV	Inhibina	A M L	CD-34	CD-68	Triptasa	RE	RP y RA
C. Sertoli	X	X	X		X						X
Tejido peritubular				X		X	X				X
C. Leydig			X		X						X
Células estromales CD34+							X				X
Macrófagos								X			
Mastocitos									X		
Albugínea						X					
Rete testis										X	X
Epidídimo										X	X
Pared muscular epidídimo											X

CK: citoqueratina, Col.: colágeno, AML: actina de músculo liso, RE: receptor de estrógenos, RP: receptor de progesterona, RA: receptor de andrógenos.

## 2.7. Variables clínicas

Se accedió a los informes anatomopatológicos a través del programa PAT-Win v.4.7.6.5 y a la historia clínica. Se registraron los siguientes datos:

- **Edad** a la que se sometió la paciente a la **cirugía de reasignación de género**
- Enfermedades **cardiovasculares** y factores de riesgo cardiovascular
- Información relativa a la **terapia hormonal**:

- Tipos de fármacos empleados
- Dosis y posología
- Edad de inicio y duración del tratamiento
- Automedicación y adherencia terapéutica
- Tiempo de suspensión previo a la cirugía
- **Valores hormonales:**
  - FSH y LH (mUI/ml)
  - Estradiol (pg/ml)
  - Testosterona basal (ng/100 ml)

## 2.8. Manejo de datos

Se registraron de forma informatizada las variables en una base de datos creada con el programa Excel, con la estructura adecuada para poder analizar los datos posteriormente.

## 2.9. Evaluación de la relación entre los hallazgos encontrados y el síndrome de disgenesia testicular

Se compararon los hallazgos observados con los descritos en el síndrome de disgenesia testicular (413-416,428,430).

## 2.10. Técnicas fotográficas

Las imágenes microscópicas han sido capturadas con dos cámaras digitales de la marca Olympus (modelos DP70 y DP72), almacenadas en formato JPG y tratadas con el programa Adobe Photoshop Elements 2.0 ®.

### **2.11. Aspectos éticos**

La investigación se ha realizado conforme a lo establecido en la Ley 14/2007 de investigación biomédica y siguiendo los principios éticos de la Declaración de Helsinki para investigación médica en muestras humanas. Durante el desarrollo de la investigación en todo momento se han respetado los derechos y libertades fundamentales, con garantías de confidencialidad en el tratamiento de los datos de carácter personal, conforme a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 del 13 de diciembre, y de las muestras biológicas.

El proyecto fue previamente evaluado y aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario La Paz.

Tras finalizar la investigación las muestras se han devuelto al archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz.

## ***RESULTADOS***

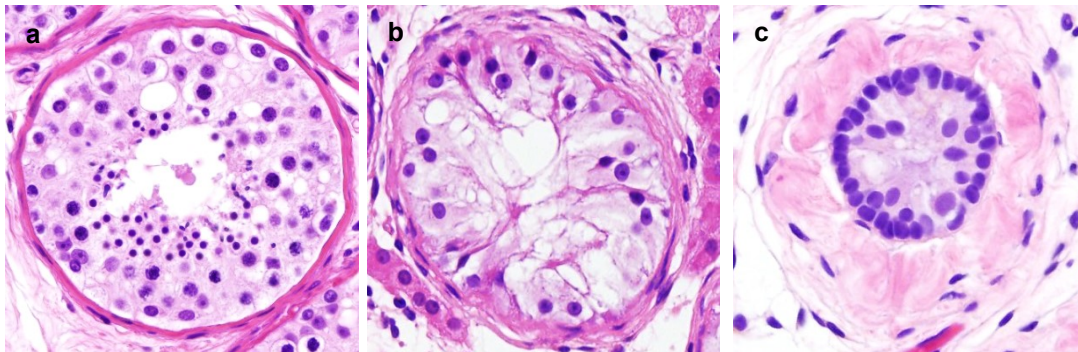


## RESULTADOS

### 1. Estudio morfológico

#### 1.1. Patrones histológicos del parénquima testicular

El estudio de la morfología de los tubos seminíferos, confirma la existencia de 3 patrones histológicos descritos previamente por Nistal et al (31) en pacientes que habían recibido tratamiento con estrógenos y antiandrógenos a largo plazo previamente a la cirugía de reasignación de género. Las características histológicas de los 3 patrones se recogen en la **Figura 7** y en la **Tabla 6**.



**Fig 7.** Patrones histológicos de los tubos seminíferos

**7a)** Patrón I: Sección tubular transversal en la que se observa una espermatogénesis completa con disminución del número de espermátidas adultas.

**7b)** Patrón II: Tubo seminífero con ausencia de células germinales, mínima luz y células de Sertoli de núcleo esférico con nucléolo central.

**7c)** Patrón III: Tubo seminífero con intensa hialinización de la pared tubular y sólo células de Sertoli de núcleos elongados sin nucléolos.

**Tabla 6.** Características morfológicas de los patrones histológicos testiculares

Patrón histológico	DTM	Luz tubular	Morfología nuclear de las células de Sertoli	Células germinales
I Adulto	Ligera disminución	Presente	Monoestratificadas. Núcleos triangulares irregulares con nucléolo prominente	Espermatogénesis completa cuantitativamente anormal de forma parcheada o difusa
II Puberal	Disminución intermedia	Presente o ausente	Pseudoestratificación variable. Núcleos redondos de contorno liso con nucléolo visible poco prominente	Espermatogénesis incompleta
III Infantil	Marcada disminución	Ausente	Pseudoestratificación parcheada o difusa. Núcleos redondos o fusiformes con nucléolos inconspicuos	Espermatogénesis ausente o espermatogonias focales o parcheadas

DTM: diámetro tubular medio

Se clasificaron las 42 pacientes según el patrón histológico predominante (PHP) observado en la pieza de orquiectomía bilateral. El patrón histológico más frecuentemente observado fue el patrón II. Se encontró un patrón histológico secundario de forma focal en 17 pacientes. En 6 pacientes los hallazgos histopatológicos de la pieza de orquiectomía bilateral fueron asimétricos (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Piezas de orquiectomía bilateral, clasificadas según el patrón histológico predominante. Se especifica cuántas pacientes presentaron patrones secundarios focales y/o asimetría

PHP	Patrones secundarios focales (n)				Asimetría entre testículo derecho e izquierdo (n)			
	I	II	III	I y III	Volumen testes y espesor albugínea	% de hialinización	% de hialinización y patrones	Cantidad de tubos hipoplásicos
I (n=4)		1						
II (n= 28)	6		7	1	1	1	2	1
III (n=10)		2					1	

PHP: Patrón histológico predominante, n: número de pacientes.

## 1.2. Volumen testicular

El volumen testicular estuvo disminuido en el 77% de los testículos. El valor tomado de referencia de normalidad es  $\geq 13$  ml (460). Los volúmenes testiculares medios se recogen en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Volúmenes testiculares medios (rango), según el patrón histológico

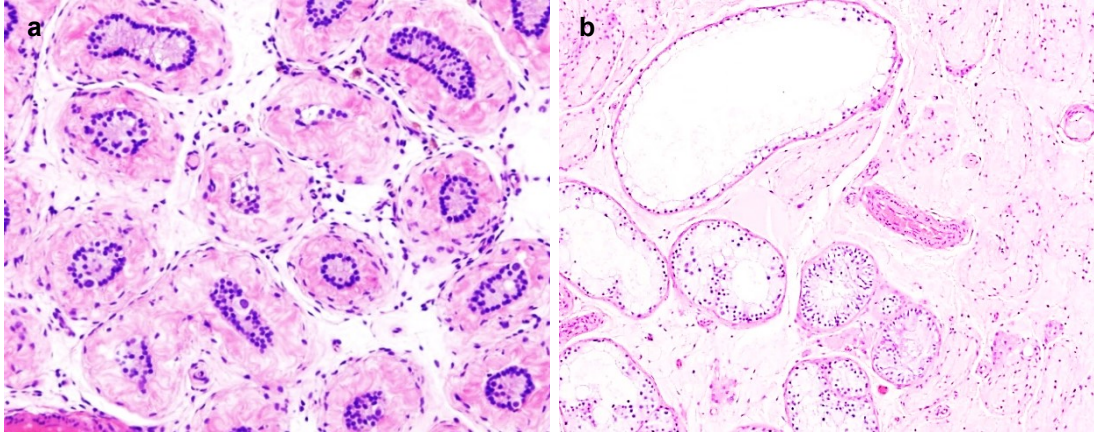
PHP	Volúmenes testiculares medios (rango)
I	12,876 ml (8,377-23,562)
II	10,167 ml (2,094-43,589)
III	8, 489 ml (1,832-23,562)

PHP: Patrón histológico predominante.

## 1.3. Tubos seminíferos

En todos los testículos el diámetro tubular medio estuvo disminuido (**Fig. 8a.**) y el espacio intertubular aumentado. Todos los testículos con PHP I mostraron ectasia tubular y este hallazgo morfológico también se observó en 5 pacientes con PHP II (**Fig. 8b.**). En el 95% de las pacientes se observaron tubos seminíferos con pérdida de la luz tubular y en una paciente con patrón histológico II se observó un tubo en anillo con una calcificación central (**Fig. 8c.**). Además, en el 76% de las pacientes se observaron tubos seminíferos

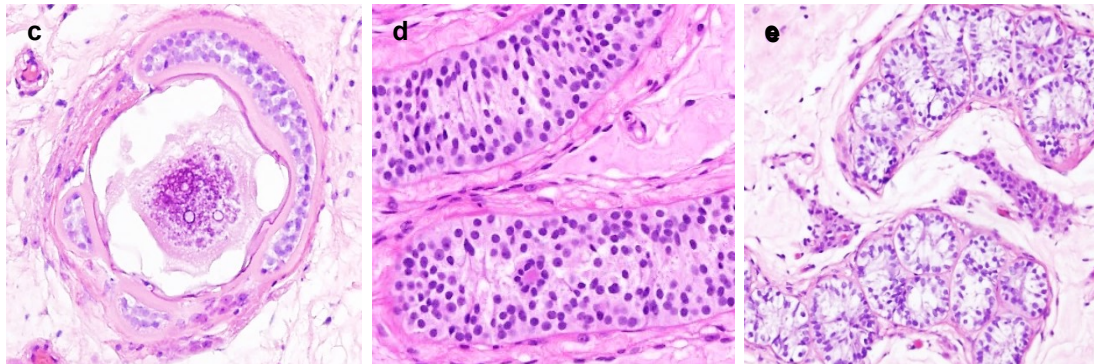
muy atróficos, aislados (**Fig. 8d.**) y/o agregados (**Fig. 8e.**), similares a los tubos hipoplásicos de los testículos adultos.



**Fig. 8.** Cambios morfológicos encontrados en los tubos seminíferos

**8a)** Tubos seminíferos con diámetro tubular medio disminuido, pérdida de la luz y engrosamiento de la pared tubular.

**8b)** Tubos seminíferos con variabilidad del diámetro tubular. Se observan tubos hialinizados y un tubo ectásico.



**8c)** Tubo en anillo con calcificación central.

**8d)** Tubos hipoplásicos aislados.

**8e)** Zonas hipoplásicas.

La atrofia tubular y la proporción de tubos seminíferos atróficos similares a hipoplásicos aumentó de forma paralela al patrón histológico. Los hallazgos histopatológicos identificados en los tubos seminíferos se recogen en las **Tablas 9 y 10**. Los valores tomados de referencia de normalidad para el diámetro tubular medio fueron: 180-200  $\mu\text{m}$  (461).

**Tabla 9.** Diámetro tubular medio, espacio intertubular medio y número de pacientes en las que se observó ectasia y/o pérdida de luz tubular, según el patrón histológico

PHP	DTM (rango)	Espacio intertubular M (rango)	Ectasia (n)	Pérdida de luz (n)			
				A	F	P	D
I	155,548 $\mu$ m (85,78-234,14)	25,892 $\mu$ m (0-82,88)	4	2	2		
II <sup>a</sup>	109,724 $\mu$ m (22,82-241,23)	31,802 $\mu$ m (0-253,95)	5		12	8	8
III <sup>b</sup>	66,183 $\mu$ m (23,97-150,61)	34,864 $\mu$ m (4,51-230,94)				3	7

PHP: Patrón histológico predominante, DTM: diámetro tubular medio, M: media, A: ausente, F: focal, P: parcheada, D: difusa. n: número de casos

<sup>a</sup> PHP II: No se pudo medir el DTM en 1 testículo (<10 tubos no hialinizados) y en 1 testículo solo se midieron 10 tubos (<20 tubos no hialinizados).

<sup>b</sup> PHP III: No se pudo medir el DTM en 2 piezas de orquiectomía bilateral y en 1 testículo (<10 tubos no hialinizados) y en 1 pieza de orquiectomía bilateral solo se midieron 10 tubos (<20 tubos no hialinizados).

**Tabla 10.** Número de pacientes en las que se observaron tubos atróficos similares a tubos hipoplásicos, según el patrón histológico

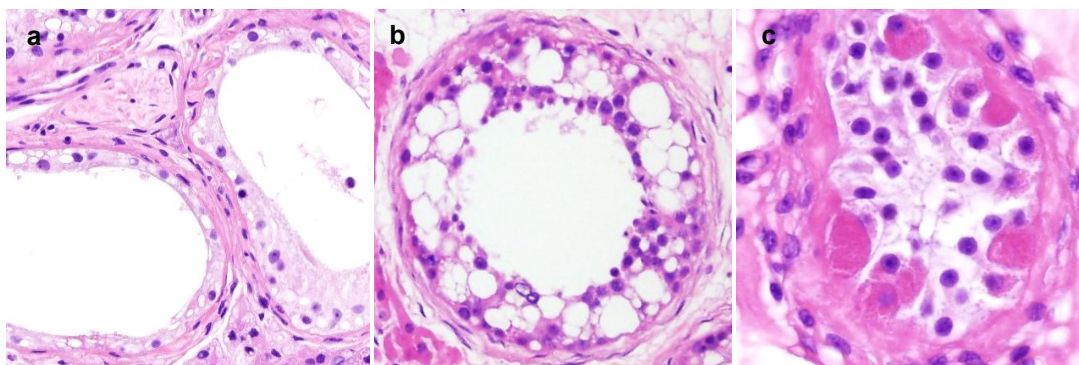
PHP	Tubos atróficos similares a tubos hipoplásicos									
	Aislados (n)			Zonas hipoplásicas (n)			Nódulos de Sertoli (n)			Zonas hipoplásicas y nódulos de Sertoli (n)
	F	P	D	F	P	D	F	P	D	
I	1									
II	14	8		6	2		2			2
III	5	2	2	8			2			2

PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos F: focales, P: parcheados, D: difusos.

### 1.3.1. Epitelio seminífero

En todos los testículos con PHP I y en 8 piezas de orquiectomía bilateral con PHP II se observaron células de Sertoli con pérdida de altura citoplasmática (**Fig. 9a.**). Todos los testículos mostraron vacuolización citoplasmática en las células de Sertoli (**Fig. 9b.**) y en 9 piezas de orquiectomía bilateral con PHP II o III también se observó cambio eosinófilo granular en células de Sertoli que revestían tubos seminíferos sin espermatogénesis (**Fig. 9c.**). Además, en el 93% de las pacientes se observó pseudoestratificación de los núcleos de las células de Sertoli.





**Fig. 9.** Cambios morfológicos hallados en el epitelio seminífero

**9a)** Tubos ectásicos con atrofia de células de Sertoli.

**9b)** Tubo seminífero revestido por células de Sertoli con intensa vacuolización citoplasmática.

**9c)** Tubo seminífero revestido por células de Sertoli con cambio eosinófilo granular focal.

La proporción de núcleos pseudoestratificados aumentó paralelamente al PHP. La morfología nuclear predominante fue la correspondiente al patrón histológico. Los hallazgos morfológicos observados a nivel de las células de Sertoli se resumen en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.** Número de pacientes que mostraron alteraciones en las células de Sertoli y morfología nuclear de las mismas, según el patrón histológico

PHP	Epitelio seminífero (n)	Citoplasma (n)		Núcleos (n)												
	Atrofia focal	Cambio eosinófilo granular focal	Vacuolado	Pseudo- estratificación				Triangular irregular con núcleolo prominente			Redondo de contorno liso con núcleolo visible			Redondo o fusiforme núcleolo inconspicuo		
				A	F	P	D	F	P	D	F	P	D	F	P	D
I	4		4	2	2				1	3		1				
II	8	7	28	1	4	7	16	8	1			9	19	8	8	
III		2	10			3	7				2					10

PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos, A: ausente, F: focal/es, P: parcheada/os, D: difusa/os.

### 1.3.2. Células germinales

En la **Tabla 12**, se recogen el número de casos en los que se observaron los distintos tipos de células germinales.

**Tabla 12.** Proporción de células germinales presentes en las pacientes, según el patrón histológico

PHP	Tubos con sólo Sertoli (n)				Espermatogonias (n)				Espermatocitos I (n)				Espermátidas redondas (n)				Espermátidas elongadas (n)			
	A	F	P	D	A	F	P	D	A	F	P	D	A	F	P	D	A	F	P	D
I	4							4				4			1	3			1	3
II	13	7	7	1 <sup>a</sup>		2	9	17	9	10	9		17	8	3		20	7	1	
III			4	6	3	3	4		10				10				10			

PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos, A: ausentes, F: focales, P: parcheadas, D: difusas.

<sup>a</sup> Patrón histológico secundario III.

El patrón de espermatogénesis más frecuente fue la presencia de solo espermatogonias. La espermatogénesis fue completa, aunque cuantitativamente anormal, en todas las piezas de orquiectomía con PHP I y ausente o con parada en espermatogonias en todas las piezas de orquiectomía con PHP III. En las piezas de orquiectomía con PHP II la espermatogénesis fue variable, pero lo más frecuente fue observar espermatogénesis incompleta con parada de la maduración en espermatocitos. En la **Tabla 13** se recogen los patrones de espermatogénesis observados.

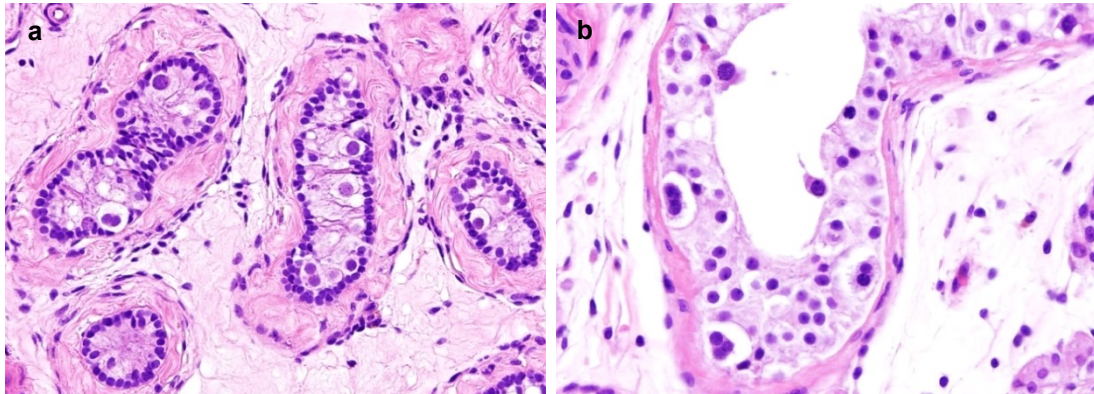
**Tabla 13.** Patrones de espermatogénesis observados en las pacientes, según el patrón histológico

PHP	A (n)	Incompleta (n=27). Parada en:			Completa cuantitativamente anormal	
		Espermatogonia (n)	Espermatocito I (n)	Espermátida redonda (n)	F (n)	P o D (n)
I						4
II		8	9	3	8	
III	3	7				

PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos, A: Ausente, F: focal, P: parcheado, D: difuso.

El 86% de las pacientes mostraron espermatogonias hipertróficas (**Fig.10a**) y multinucleadas (**Fig.10a** y **10b**). También se observaron espermatocitos descamados en el 14% de las pacientes (**Fig.10b**, **10c** y **10e**), megaloespermatocitos en el 24% (**Fig. 10d**), espermátidas multinucleadas en

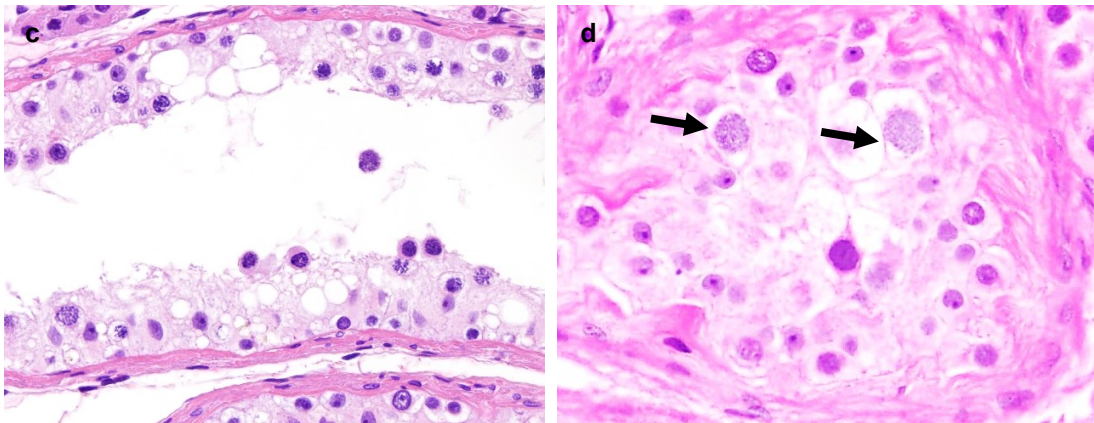
el 21% (**Fig. 10e**) y células germinales apoptóticas en el 17% de las pacientes (**Fig. 10f**).



**Fig. 10.** Hallazgos morfológicos en las células germinales

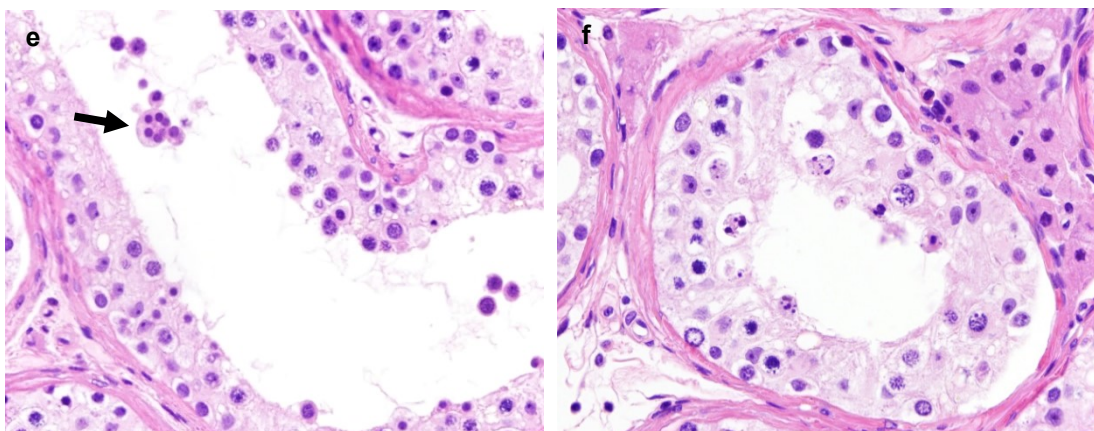
**10a)** Tubos hipoplásicos con espermatogonias hipertróficas. También se observa una espermatogonia multinucleada en el tubo de la izquierda.

**10b)** Tubo seminífero ectásico con espermatogonias multinucleadas sobre la membrana basal y aislados espermátocitos descamados en la luz.



**10c)** Tubo seminífero ectásico con espermátocitos descamados.

**10d)** Tubo seminífero con megaloespermátocitos.



**10e)** Tubo seminífero ectásico con espermátocitos descamados y una espermátida multinucleada en la luz (flecha).

**10f)** Tubo seminífero con imágenes de cariorrexis en diferentes células germinales.



La **Tabla 14.** recoge las alteraciones observadas a nivel de las espermatogonias.

**Tabla 14.** Número de pacientes en los que se observaron alteraciones en las espermatogonias, según el patrón histológico predominante

PHP	Hipertróficas (n)	Multinucleadas (n)	Núcleo irregular (n)	Vacuolización citoplasmática (n)
I	4	4	1	
II	27	27	3	2
III	5	5		

PHP: Patrón histológico predominante. n: número de casos.

El número de pacientes en las que se observaron alteraciones en los espermatocitos y/o en las espermátidas y/o imágenes de apoptosis en las células germinales se recoge en la **Tabla 15.**

**Tabla 15.** Número de pacientes que mostraron células germinales apoptóticas y/o alteraciones en los espermatocitos y/o en las espermátidas, según el patrón histológico predominante

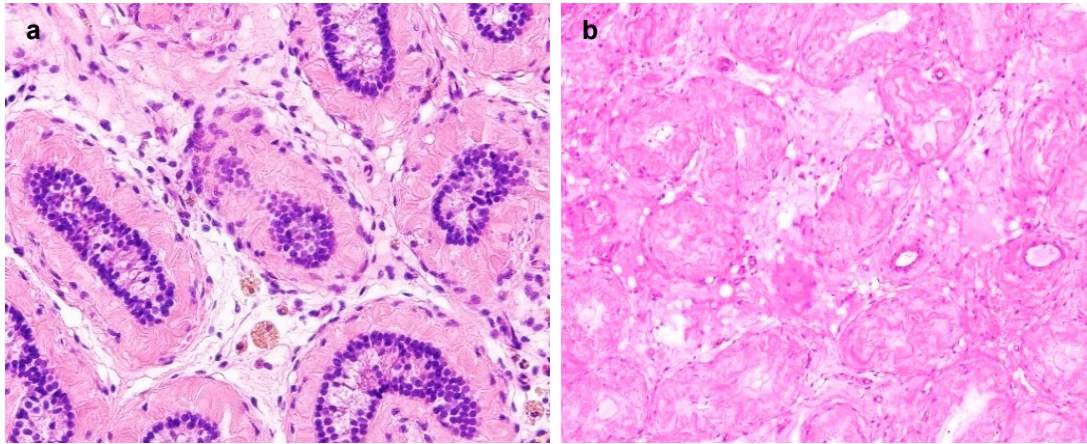
PHP	Espermatocitos descamados en la luz (n)	Megaloespermatocitos (n)	Espermátidas redondas multinucleadas (n)	Células germinales apoptóticas (n)
I	1	3	3	1
II	5	7	6	6
III				

PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos.

### 1.3.3. Pared tubular

Si tomamos como valores normales de referencia para el espesor total de la pared tubular  $\leq 6 \mu\text{m}$  (461) la media del espesor total de la pared tubular estuvo aumentada en una pieza de orquiectomía bilateral con PHP I, en el 78% de los testículos con PHP II y en todos los testículos con PHP III (**Fig. 11a**). El 88% de las pacientes mostraron tubos difusamente hialinizados con pérdida del epitelio seminífero (**Fig. 11b**) y 6 pacientes mostraron tubos seminíferos con un espesor de la membrana basal superior a  $3 \mu\text{m}$  (**Fig. 11c**). Con la técnica histoquímica de orceína se identificó un aumento del depósito

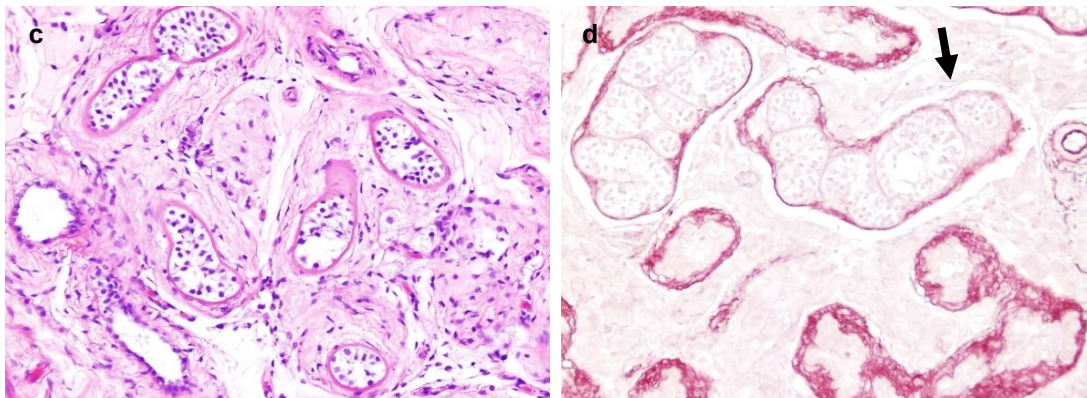
de fibras elásticas en la pared de los tubos difusamente hialinizados y se observó una pérdida de tinción focal en la pared de zonas hipoplásicas y nódulos de Sertoli en 2 pacientes con PHP III (**Fig. 11d**).



**Fig. 11.** Hallazgos morfológicos en la pared tubular

**11a)** Hialinización concéntrica de la pared tubular en tubos hipoplásicos que mantienen células de Sertoli.

**11b)** Hialinización tubular difusa con pérdida completa del epitelio seminífero.



**11c)** Tubos hipoplásicos con engrosamiento de la membrana basal.

**11d)** Pérdida focal de la tinción de orceína a nivel de la pared en una zona hipoplásica (flecha) y aumento del depósito de fibras elásticas en los tubos hialinizados.

La hialinización de la pared tubular y la proporción de tubos completamente hialinizados con pérdida del epitelio seminífero aumentó paralelamente al PHP. El espesor de la pared tubular y de sus componentes, el número de pacientes que mostraron tubos seminíferos con un espesor de la membrana basal superior a 3  $\mu\text{m}$  y la proporción de tubos seminíferos completamente

hialinizados, según el patrón histológico, se recoge en la **Tabla 16**.

**Tabla 16.** *Espesor de los componentes de la pared tubular y proporción de tubos seminíferos completamente hialinizados, según el patrón histológico*

PHP	Pared tubular total	Membrana basal	Membrana basal >3 $\mu$ m en algún tubo (n)	Depósito de material acelular intermedio	Capa mioide	Hialinización tubular completa (n)			
	Promedio (rango)			Promedio (rango)		A	F	P	D
I	5,145 (2,07-9,58)	1,337 (0,64-3,94)	1	1,549 (0-4,87)	2,255 (0,72-5,81)		2	2	
II <sup>a</sup>	10,417 (1,44-47,24)	1,191 (0,64-4,76)	3	6,456 (0-38,2)	2,757 (0,64-12,04)	5	15	7	1 <sup>c</sup>
III <sup>b</sup>	19,714 (2,52-43,30)	1,135 (0,64-4,19)	2	15,035 (0-39,35)	3,545 (1,02-15,76)		4	2	4

PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos, A: ausente, F: focal, P: parcheada, D: difusa.

<sup>a</sup> PHP II: No se midió en 1 testículo (<10 tubos no hialinizados) y sólo se midieron 10 tubos en 1 testículo (<20 tubos no hialinizados).

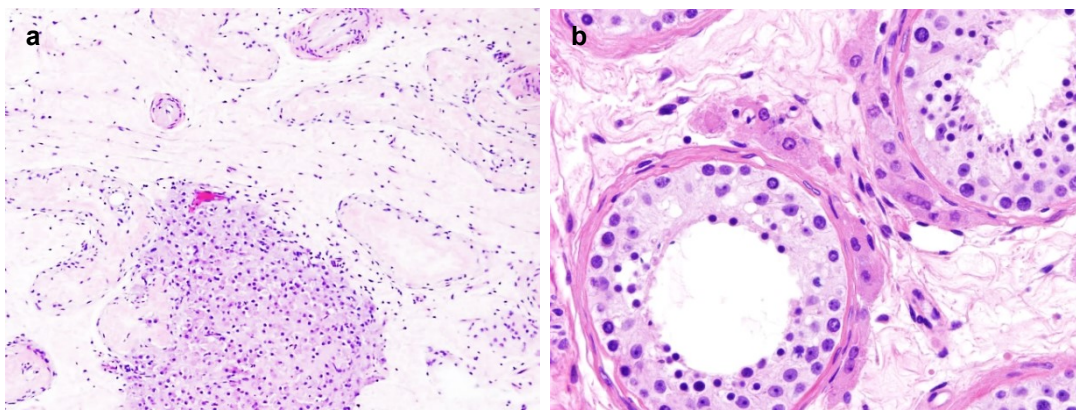
<sup>b</sup> PHP III: No se midió en 2 piezas de orquiectomía bilateral y en 1 testículo (<10 tubos no hialinizados).

<sup>c</sup> Patrón histológico III secundario.

## 1.4. Intersticio

### 1.4.1. Células de Leydig

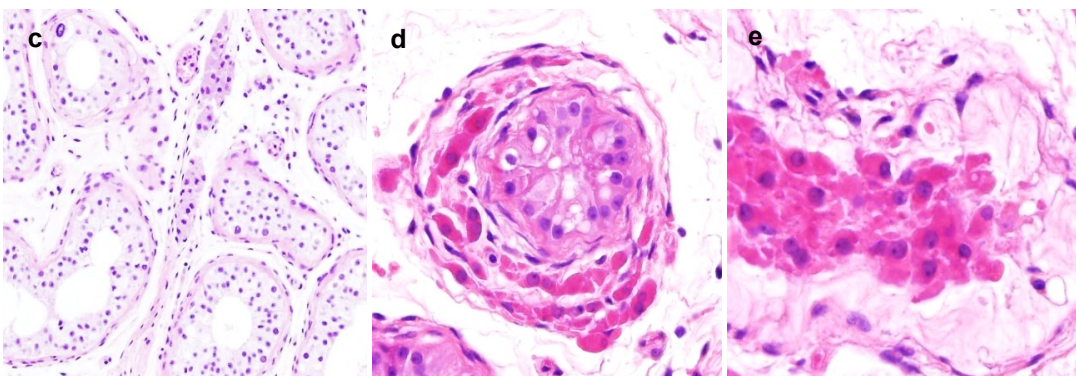
En el 64% de las pacientes se observó una distribución irregular de las células de Leydig, con áreas desprovistas de estas células y otras con hiperplasia de las mismas (**Fig. 12a**). En el 48% de las pacientes las células de Leydig se localizaron mayoritariamente alrededor de los tubos seminíferos (**Fig. 12b**), encontrándose una distribución septal en 5 pacientes (**Fig. 12c**). Además, en 5 pacientes se observaron células de Leydig en la pared tubular (**Fig. 12d**) y en 3 pacientes células de Leydig intratubulares (**Fig. 12e**).



**Fig. 12.** Distribución de las células de Leydig

**12a)** Agrupación de células de Leydig alrededor de uno de los tubos seminíferos hialinizados.

**12b)** Grupos de células de Leydig peritubulares e intersticiales.



**12c)** Grupos de células de Leydig en un septo interlobulillar.

**12d)** Células de Leydig en la pared tubular.

**12e)** Grupo de células de Leydig en el centro de un tubo hialinizado.

En 2 pacientes con PHP III no se observaron células de Leydig por lo que no se pudieron valorar sus características. Los hallazgos observados en el resto de las pacientes se resumen en la **Tabla 17**.

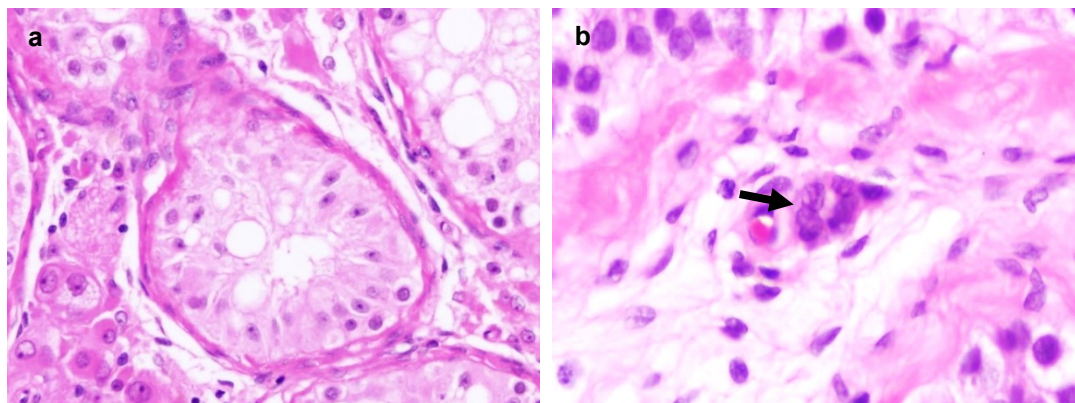
**Tabla 17.** Número de pacientes que presentaron una distribución anormal de las células de Leydig, según el patrón histológico

PHP	Irregular (hiperplasia y disminución)  (n)	Peritubular (N.º de c. Leydig peritubulares> intersticiales)  (n)	Septos inter- lobulillares  (n)	Pared tubular  (n)	Intratubulares (tubos hialinizados)  (n)
I	3	2 (2)	1		
II	21	13 (9)	4	3	1
III	3	5 (4)		2	2

PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos.



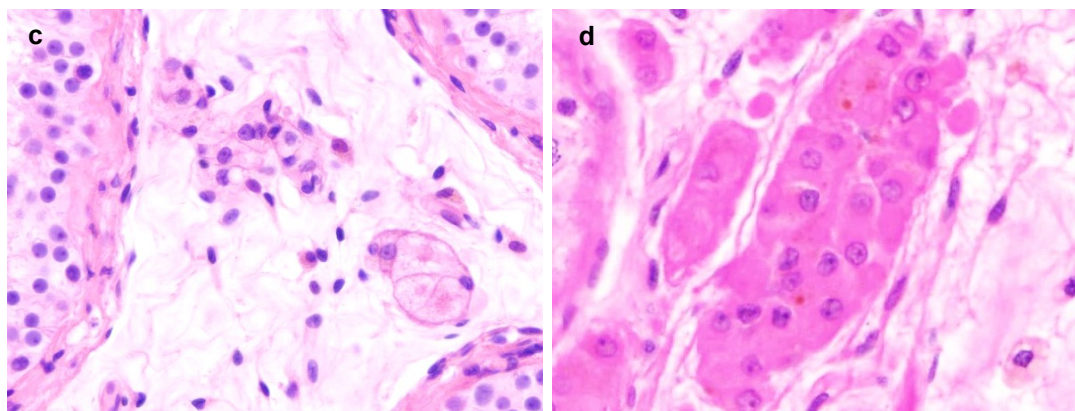
También se observaron células de Leydig pleomórficas (**Fig.13a y 13b**) y células de Leydig con vacuolización citoplasmática periférica (**Fig. 13c**). Además, en 9 pacientes se identificaron células de Leydig con abundante depósito de lipofucsina (**Fig. 13d**).



**Fig. 13.** Alteraciones del tamaño y del citoplasma de las células de Leydig

**13a)** Células de Leydig intersticiales de tamaño variable.

**13b)** Grupo de células de Leydig con citoplasma escaso y núcleos hipercromáticos e irregulares.



**13c)** Células de Leydig con amplios citoplasmas microvacuolados.

**13d)** Grupo de células de Leydig con lipofuscinas citoplasmáticas.

El número de pacientes en el que se observaron estos hallazgos se recoge en la **Tabla 18**.

**Tabla 18.** Número de pacientes con alteraciones del tamaño y/o citoplasmáticas en las células de Leydig, según el patrón histológico

PHP	Células de Leydig hipertróficas (n)	Células de Leydig involutivas (n)	Vacuolización periférica (n)	Aumento de lipofucsina (n)
I	3		4	2
II	11 sólo hipertróficas	9 sólo involutivas	28	6
	Ambas alteraciones: 6			
III		5	7	1

PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos.

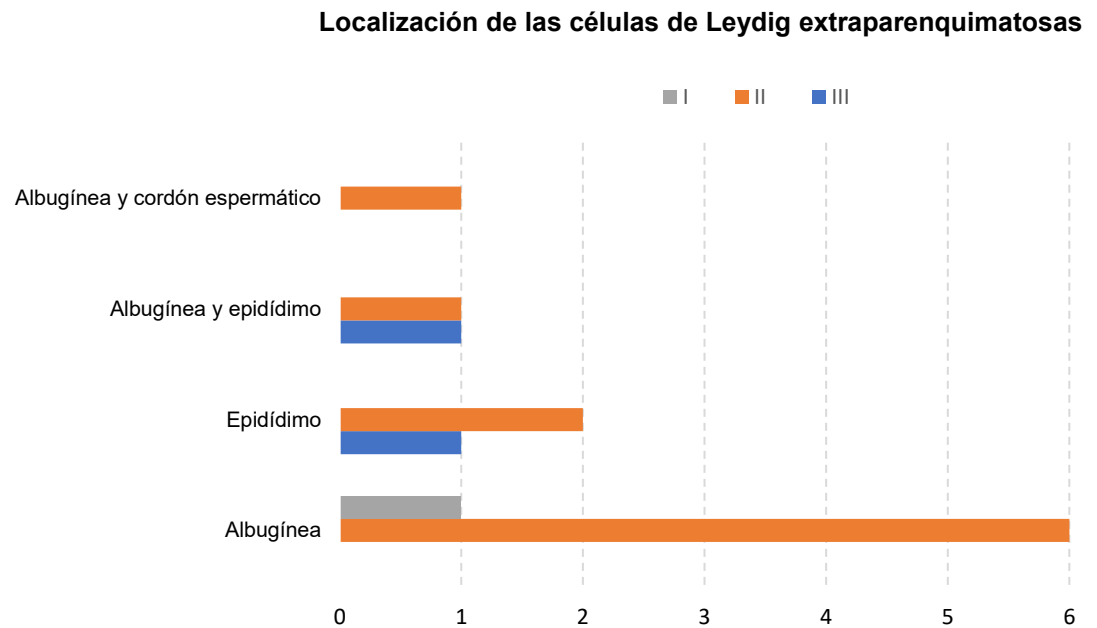
Las características morfológicas nucleares de las células de Leydig se resumen en la **Tabla 19**.

**Tabla 19.** Número de pacientes con alteraciones nucleares y morfología nuclear de las células de Leydig, según el patrón histológico

PHP	Núcleos hipertróficos (n)	Núcleos irregulares (n)	Multi-nucleación (n)	Predominan los núcleos con nucléolo (n)	Núcleos hipercromáticos y con nucléolo de forma parcheada (n)	Predominan los núcleos hipercromáticos (n)
I	1	4	3	3	1	
II	3	28	14	14	11	3
III		6			2	5

PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos.

En el 31% de las pacientes se observaron células de Leydig extraparenquimatosas (**Fig. 14**).

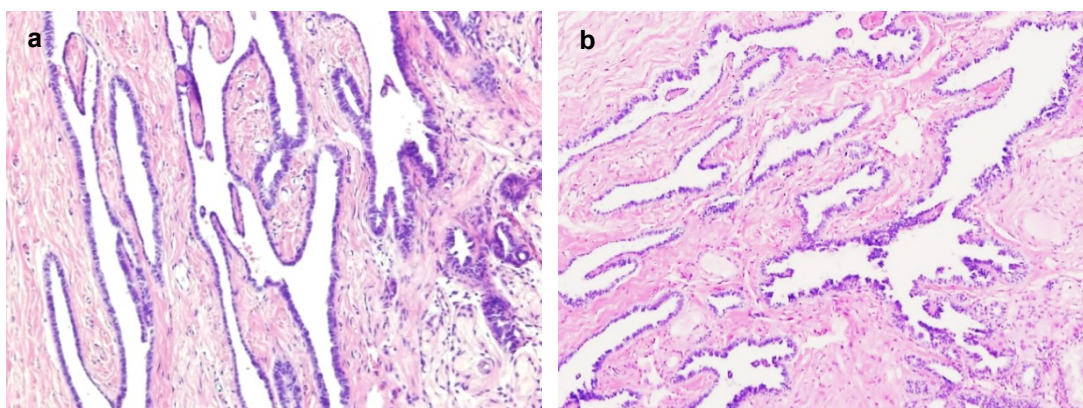


**Fig. 14.** Número de pacientes que mostraron células de Leydig extraparenquimatosas y en qué localización, según el patrón histológico predominante

## 1.5. Vías espermáticas

### 1.5.1. Rete testis

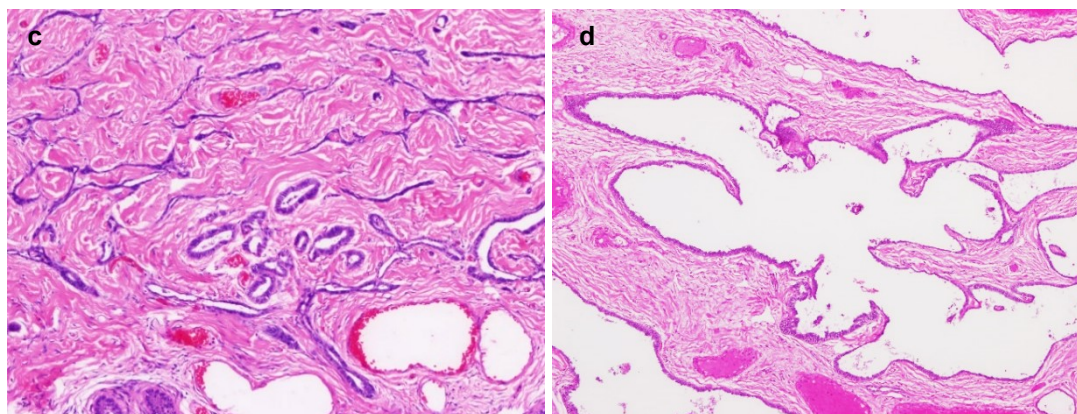
En el 76% de las pacientes se observó metaplasia cúbica de la rete testis (**Fig. 15a**). Además, se observó hiperplasia (**Fig.15b**), atrofia (**Fig.15c**) y dilatación (**Fig. 15d**).



**Fig. 15.** Hallazgos morfológicos en la rete testis

**15a)** Cavidades de la rete testis mediastínica revestidas por epitelio cúbico.

**15b)** Proliferación del epitelio de la rete testis que protruye en las cavidades que reviste.



**15c)** Rete testis septal bien conservada y rete mediastínica colapsada con atrofia del epitelio.

**15d)** Cavidades de la rete testis mediastínica dilatadas.

Las lesiones observadas en la rete testis se recogen en la **Tabla 20**.



**Tabla 20.** Número de pacientes que mostraron lesiones en la rete testis, según el patrón histológico

PHP	Metaplasia cúbica (n)	Atrofia (n)	Hiperplasia adenomatosa (n)	Dilatación (n)	Vacuolización (n)
I	2	1		1	1
II	21	8	4 (2: patrón papilar)	1	1
III	9	3			1

PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos.

### 1.5.2. Epidídimo

El diámetro medio de los conductillos eferentes y del conducto epididimario disminuyó a medida que aumentó el PHP (**Tabla 21.**).

**Tabla 21.** Diámetro medio (rango) del conducto epididimario y de los conductillos eferentes, según el patrón histológico

PHP	Diámetro medio (rango) de los conductillos eferentes	Diámetro medio (rango) del conducto principal del epidídimo
I	182,611 $\mu$ m (91,95-280,57)	306,519 $\mu$ m (254,86-372,81)
II <sup>a</sup>	141,963 $\mu$ m (48,01-267,68)	256,892 $\mu$ m (138,67-565,84)
III <sup>b</sup>	133,023 $\mu$ m (84,01-207,3)	258,579 $\mu$ m (163,18-589,19)

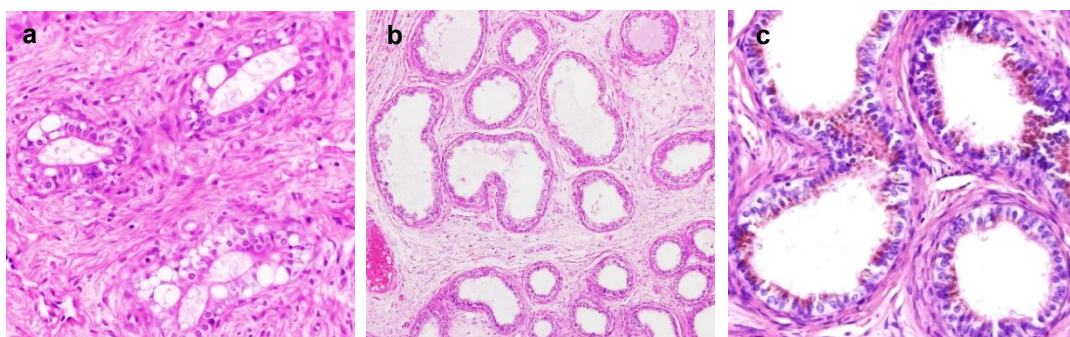
PHP: Patrón histológico predominante.

<sup>a</sup> PHP II: En 12 testículos hubo menos de 5 secciones transversales (4: conductillos eferentes y 8: conducto principal), por lo que no se midieron.

<sup>b</sup> PHP III: En 2 testículos hubo menos de 5 secciones transversales (conducto principal), por lo que no se midieron.

### Conductillos eferentes

La **Fig. 16.** muestra alteraciones observadas en los conductillos eferentes.



**Fig. 16.** Alteraciones halladas en los conductillos eferentes

**16a)** Vacuolización del epitelio de los conductillos eferentes.

**16b)** Dos grupos de conductillos eferentes, uno muestra atrofia y el otro dilatación.

**16c)** Aumento del depósito de lipofusina en el epitelio de los conductillos eferentes.



La **Tabla 22.** recoge las lesiones observadas en los conductillos eferentes.

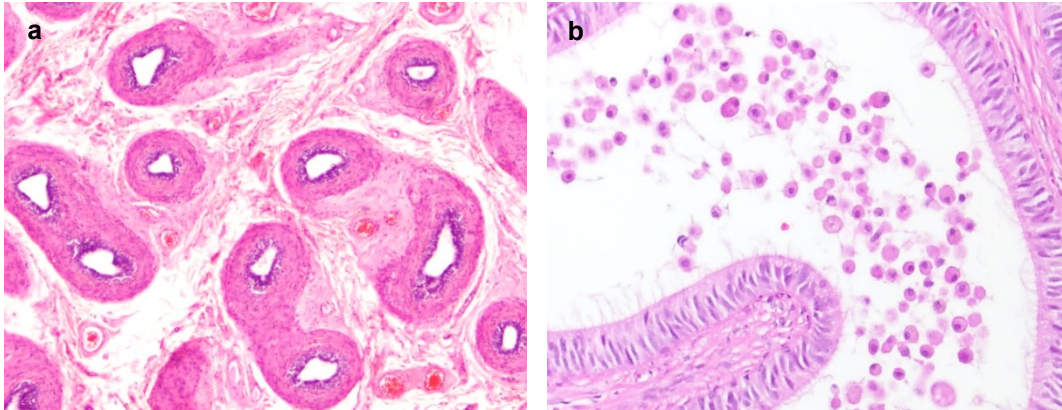
**Tabla 22.** Número de pacientes que presentaron alteraciones en los conductillos eferentes, según el patrón histológico

PHP	Pérdida del festoneado interno (n)	Atrofia (n)	Dilatación (n)	Epitelio-citoplasma		
				Vacuolización (n)	Anfófilo (n)	↑Lipofucsina (n)
I	2	3	3	3	1	3
II	14	25	4	22	3	14
III	1	10	2	10		7

PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos.

### Conducto principal del epidídimo

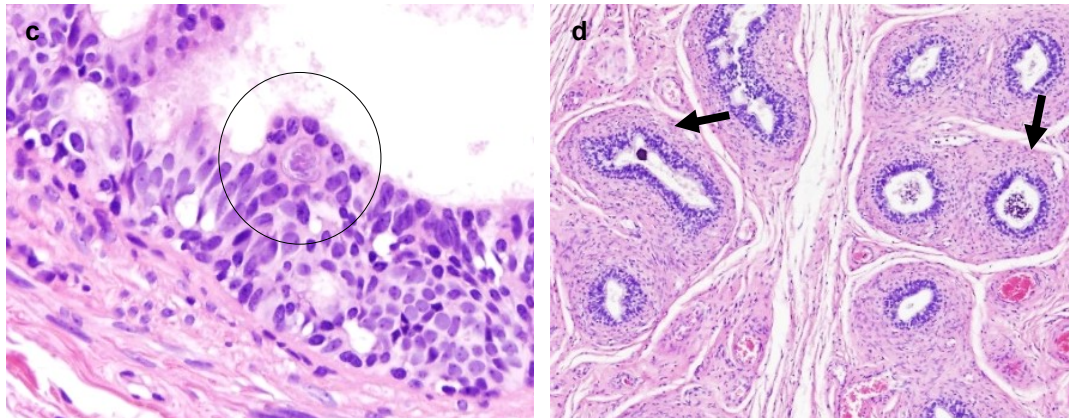
La lesión más frecuentemente identificada fue atrofia (**Fig. 17a**). Además, 6 pacientes mostraron dilatación (**Fig. 17b**) y 3 pacientes depósito de calcio (**Fig. 17c y 17d**). En la mitad de las pacientes las células principales mostraron vacuolización (**Fig. 17e**) y también se observó hiperplasia (**Fig. 17f**) y atrofia de las células basales (**Fig. 17g**) en 5 y 35 pacientes, respectivamente.



**Fig. 17.** Cambios morfológicos encontrados en el conducto principal del epidídimo

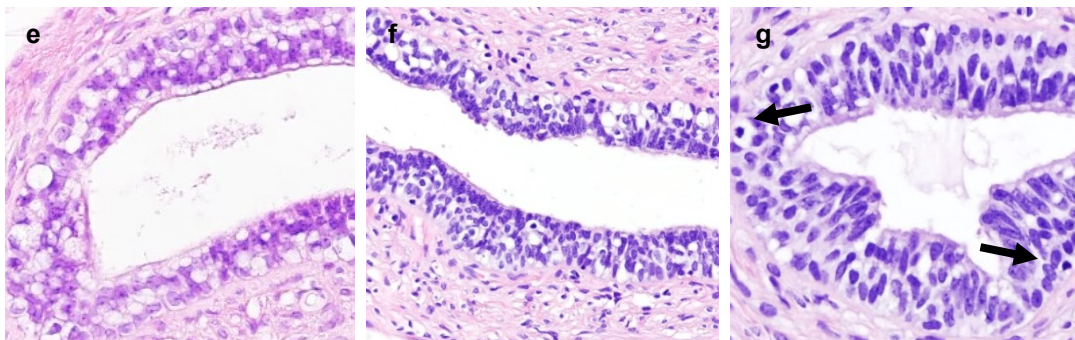
**17a)** Atrofia del conducto principal del epidídimo.

**17b)** Conducto principal del epidídimo dilatado con macrófagos en la luz.



**17c)** Microcalcificación (círculo) en una cavidad del patrón cribiforme.

**17d)** Concreciones calcificadas (flechas) en la luz del conducto principal del epidídimo.



**17e)** Vacuolización del citoplasma de células principales y basales.

**17f)** Conducto principal epididimario con hiperplasia de células basales.

**17g)** Células basales con citoplasmas vacuolados y núcleos hiper cromáticos.

Las lesiones observadas en el conducto principal del epidídimo se recogen en la **Tabla 23**.

**Tabla 23.** Número de pacientes con lesiones en el conducto principal del epidídimo, según el patrón histológico

PHP	Pérdida de estereocilios en cuerpo (n)	Pérdida del patrón cribiforme en cuerpo (n)	Atrofia (n)	Células principales hipertróficas (n)	Hiperplasia de cola de epidídimo (n)	Dilatación (n)	Microlitiasis en cuerpo (n)	Concreción calcificada cuerpo (n)
I			2	2		3		
II <sup>a</sup>	12	9	25	3	1 <sup>b</sup>	2	2	
III	10	10	9	1		1		1
PHP	Vacuolización citoplasmática de células principales (n)			Células basales hiperplásicas <sup>c</sup> (n)		Células basales atróficas (vacuolización citoplasmática y núcleos irregulares e hiper cromáticos) (n)		
	PP del CE	Cuerpo / cola	PP del CE y cuerpo/ cola	PP del CE	Cuerpo	PP del CE	Cuerpo / cola	PP del CE y cuerpo/ cola
I		1				2		
II	9	2	2	1	1	11	6	7
III	5	2		2	1	4	4	1

PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos, PP del CE: Porción proximal del conducto principal del epidídimo.

<sup>a</sup> En 1 paciente no se incluyó conducto principal del epidídimo durante el tallado.

<sup>b</sup> Coexistencia con atrofia del conducto principal del epidídimo.

<sup>c</sup> Coexistencia con atrofia de células basales.

Otras lesiones observadas a nivel del epidídimo y el número de pacientes con hallazgos asimétricos se recogen en la **Tabla 24**.

**Tabla 24.** Número de pacientes con otras lesiones y hallazgos asimétricos en el epidídimo, según el patrón histológico

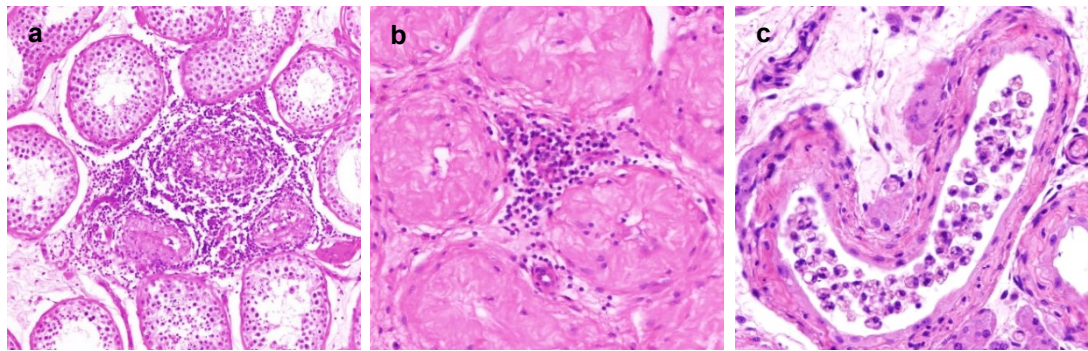
PHP	Quistes de restos embrionarios (n)	Tejido ectópico suprarrenal (n)	Hallazgos asimétricos en el epidídimo (n)
I	1		
II	2	1	<sup>a</sup> 9
III	2		

PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos.

<sup>a</sup> Hiperplasia de la cola del epidídimo (n=1), vacuolización de las células principales (n=4), infiltrados inflamatorios (n=3), características citoplasmáticas de los conductillos eferentes (n=2), vacuolización del epitelio de los conductillos eferentes (n=1), dilatación del conducto principal del epidídimo (n=1), atrofia de células basales (n=2).

### 1.6. Células inflamatorias

En el 64% de las pacientes se observaron infiltrados de linfocitos peritubulares (**Fig. 18a**) y el 48% mostraron infiltrados de linfocitos intersticiales focales (**Fig. 18b**). También se identificaron macrófagos intratubulares (**Fig. 18c**).



**Fig. 18.** Infiltrados inflamatorios en el parénquima testicular

**18a)** Densos infiltrados de linfocitos destruyendo 3 tubos seminíferos.

**18b)** Tubos difusamente hialinizados y un foco de linfocitos en el espacio intertubular.

**18c)** Acúmulo de macrófagos en el interior de un tubo seminífero con atrofia del epitelio seminífero.

El número de pacientes en los que se observaron infiltrados inflamatorios en el parénquima testicular y en la túnica vaginal se recoge en la **Tabla 25**.

**Tabla 25.** Número de pacientes que mostraron infiltrados inflamatorios en los tubos seminíferos, el espacio intersticial y la túnica vaginal, según el patrón histológico

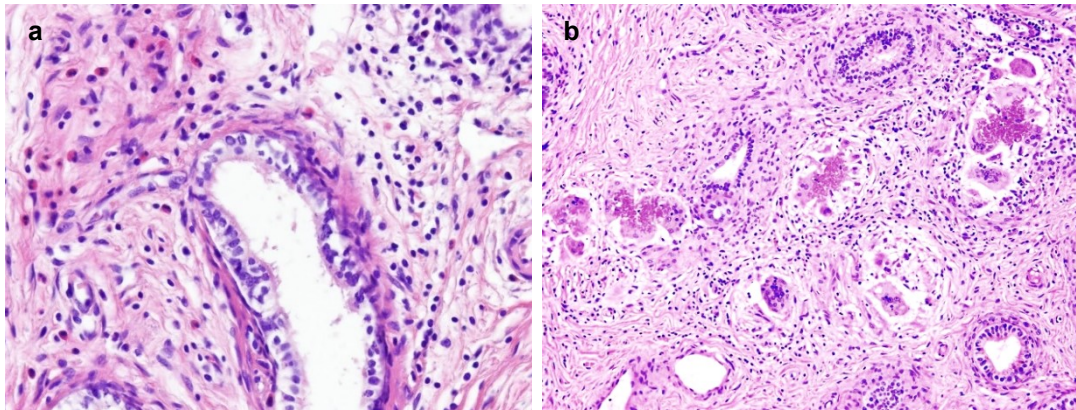
PHP	Tubulitis			Macrófagos intratubulares	Infiltración de linfocitos focal en el intersticio	Hemosiderófagos Intersticiales	Infiltrados linfoides aislados en la túnica vaginal
	(n)			(n)	(n)	(n)	(n)
	FAC	FC	PC				
I		4		1	2		1
II	1	15		3	12	7	6
III		6	2	3	6	5	

PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos, FAC: focal aguda y crónica, FC: focal crónica, PC: parcheada crónica.

También se observaron infiltrados inflamatorios en los conductillos eferentes (**Fig. 19a y 19b**) y en el conducto principal del epidídimo (**Fig. 19c y**



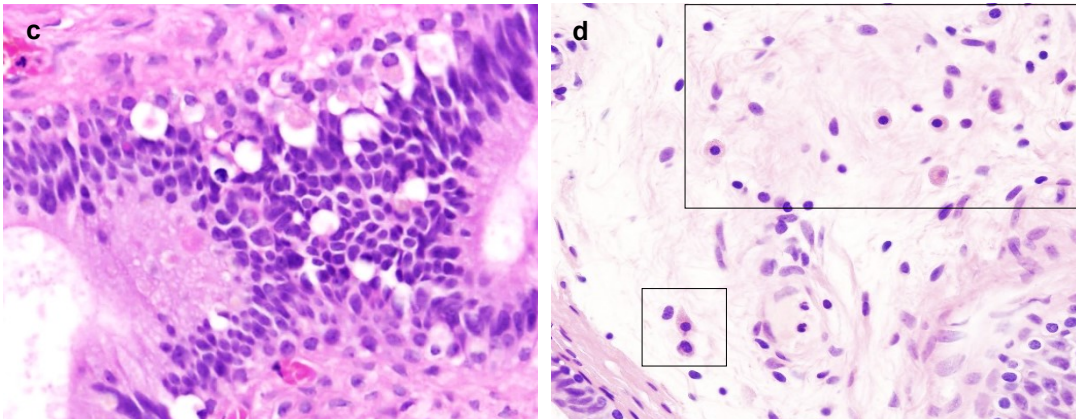
19d).



**Fig. 19.** Infiltrados inflamatorios en el epidídimo

**19a)** Infiltrados de linfocitos entremezclados con eosinófilos a nivel de los conductillos eferentes.

**19b)** Reacción de células gigantes multinucleadas sobre conductillos eferentes necróticos.



**19c)** Abundantes macrófagos en un corte tangencial del conducto epididimario.

**19d)** Presencia de abundantes mastocitos (rectángulos) en el conducto principal del epidídimo

Los infiltrados inflamatorios observados en el epidídimo se recogen en la

**Tabla 26.**

**Tabla 26.** Número de pacientes con infiltrados inflamatorios a nivel del epidídimo, según el patrón histológico

PHP	Conductillos eferentes (n)			Conducto principal del epidídimo (n)		
	Infiltración de linfocitos	Epididimitis isquémica	Macrófagos en la luz	Infiltración de linfocitos	Abundantes macrófagos intraepiteliales	Mastocitosis
I	1				1	
II	5 <sup>a</sup>	1		2	3	2
III	2		2 <sup>b</sup>			1

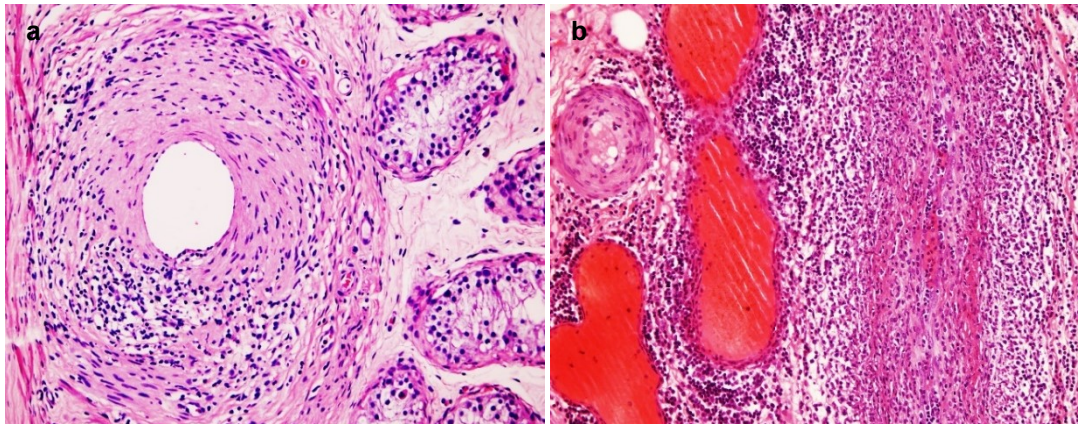
PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos.

<sup>a</sup> En 1 paciente linfocitos entremezclados con eosinófilos.

<sup>b</sup> En 1 paciente: hemosiderófagos.

### 1.7. Estructuras vasculares

El hallazgo más llamativo fue la presencia en 2 pacientes de vasculitis en arterias de pequeño-mediano tamaño, segmentaria no necrotizante (**Fig. 20a**) y necrotizante (**Fig. 20b**), con un infiltrado inflamatorio preferentemente a expensas de linfocitos, sin eosinófilos.



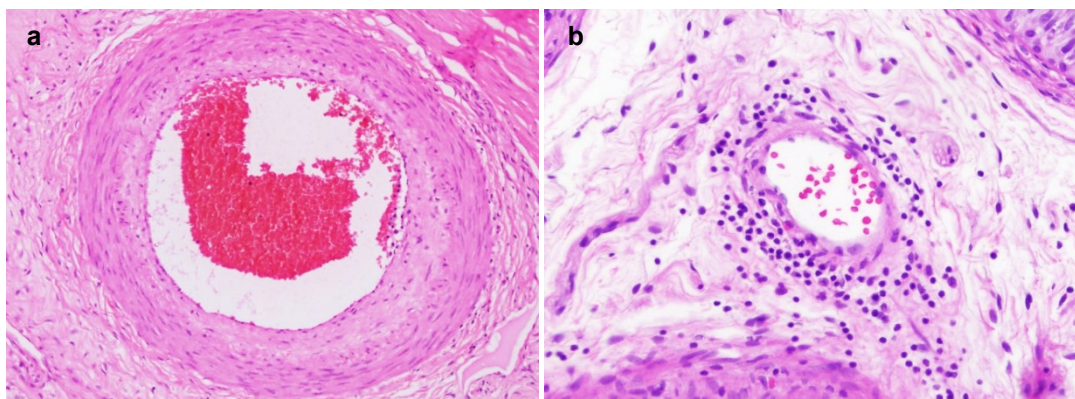
**Fig. 20.** Hallazgos morfológicos de vasculitis

**20a)** Infiltrado linfoide segmentario en la pared de una arteria con marcada fibrosis de la íntima.

**20b)** Sección longitudinal de una arteria de pequeño calibre con necrosis de su pared y abundante infiltrado linfoide.

La lesión arterial más frecuentemente observada fue la hialinosis arteriolar. En 21 pacientes (edad media: 35 años, rango 22-62) se observó aterosclerosis (**Fig. 21a**). A nivel de las venas el hallazgo más frecuentemente observado fue la presencia de infiltrados de linfocitos perivenulares (**Fig. 21b**). También se observó hialinización de la pared de las venas (**Fig. 21c**) y dilataciones venosas (**Fig. 21d**).

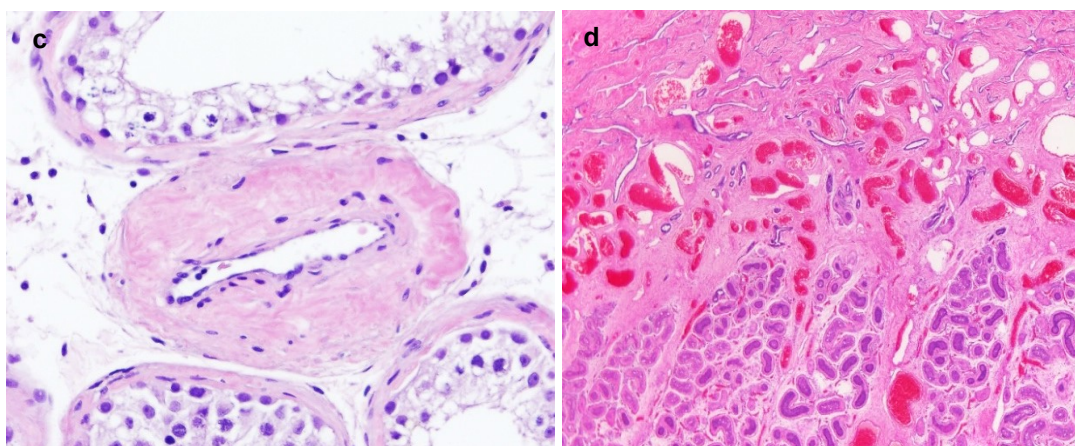




**Fig. 21.** Otras lesiones arteriales y venosas

**21a)** Pared arterial con fibrosis intimal.

**21b)** Infiltrado linfocitario alrededor de una vénula.



**21c)** Vena que muestra hialinización de su pared.

**21d)** Dilataciones venosas alrededor de las cavidades de la rete testis.

En ninguna paciente figuraba la presencia de hipertensión arterial o alteraciones de los niveles de glucosa en sangre en la historia clínica. El número de pacientes con lesiones de aterosclerosis, vasculitis y epididimitis isquémica en relación con la presencia de factores de riesgo o enfermedad cardiovascular se recoge en la **Tabla 27**.

**Tabla 27.** Número de pacientes con aterosclerosis, arteritis y/o epididimitis isquémica, según la ausencia o presencia de factores de riesgo cardiovascular y el patrón histológico predominante

PH P	Factores de riesgo o enfermedad cardiovascular (n)	Aterosclerosis (n)	Arteritis (n)	Epididimitis isquémica (n)
I	GC:1, IMC:1	1 (GC)		
II	GC:4, IMC:2, TBQ:4, APL:1	14 (TBQ:3)	2	1 (TBQ)
III	APL+EI+AAA:1	6 (APL+EI+AAA:1)		

PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos, GC: grasa corporal >30% (bioimpedancia), IMC: Índice de masa corporal  $\geq 30$ , TBQ: Tabaquismo, APL: Alteración del perfil lipídico, EI: Endocarditis infecciosa, AAA: aneurisma de aorta ascendente.

El resto de lesiones vasculares se recogen en la **Tabla 28**.

**Tabla 28.** Número de pacientes con lesiones vasculares, según el patrón histológico

PHP	Ausencia de lesiones vasculares (n)	Hialinosis arteriolar (n)	Infiltrados de linfocitos perivenulares (n)	Hialinización de la pared venosa (n)	Venas dilatadas alrededor de la rete testis (n)	Linfangi-ectasias (n)
I	1	1	3		1	
II	2	21 <sup>a</sup>	9	4	6	2
III		8 <sup>b</sup>	6	1	2	

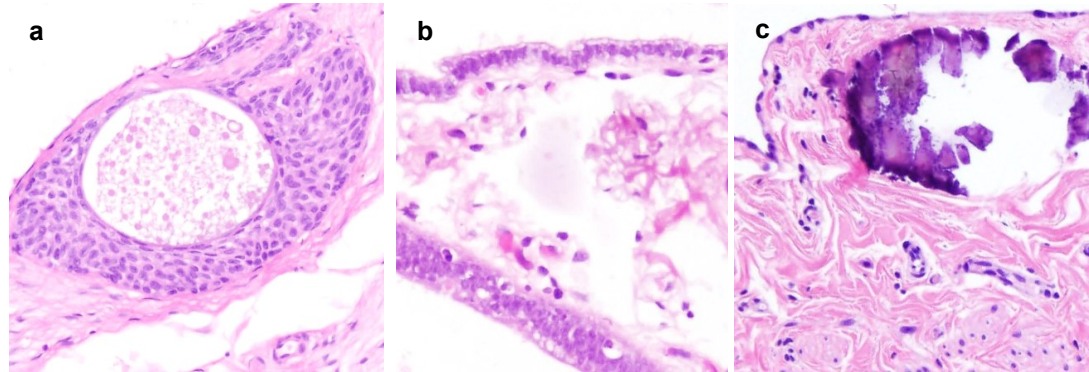
PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos.

<sup>a</sup> En 4 pacientes fue severa.

<sup>b</sup> En 2 pacientes fue severa y en 2 pacientes se observó depósito de calcio.

### 1.8. Túnica vaginal

La alteración más frecuentemente observada a este nivel fue la metaplasia epitelial (**Fig.22a y 22b**). La vacuolización del mesotelio (**Fig. 22b**) y el depósito de calcio en el tejido conectivo submesotelial (**Fig. 22c**) fueron hallazgos identificados de forma aislada.



**Fig. 22.** Alteraciones morfológicas encontradas en la túnica vaginal

**22a)** Metaplasia urotelial quística del mesotelio de la túnica vaginal.

**22b)** Metaplasia cúbica y vacuolización del mesotelio de la cavidad vaginal.

**22c)** Calcificación en el tejido conectivo submesotelial.

Las lesiones observadas en la túnica vaginal se recogen en la **Tabla 29**.



**Tabla 29.** Número de pacientes que mostraron alteraciones a nivel de la túnica vaginal, según el patrón histológico

PHP	Metaplasia		Vacuolización	Calcificación en el tejido conectivo submesotelial
	Urotelial en el seno del epidídimo (n)	Cúbica (n)		
I	1	1	2	
II	10 (5 quísticas)	6		1
III	4 (1 quística)	2		

PHP: Patrón histológico predominante, n: número de casos.

## 1.9. Albugínea

El espesor de la albugínea fue variable y en 3 pacientes se identificaron tubos seminíferos ectópicos (**Tabla 30**).

**Tabla 30.** Espesor de la albugínea y número de pacientes que presentaron tubos seminíferos ectópicos, según el patrón histológico

PHP	Espesor medio (y rango) de la albugínea	N.º de testículos (pacientes)		Tubos seminíferos ectópicos (n)
		<sup>a</sup> Espesor↓	Espesor↑	
I	476,299 µm (274,39-794,64)	2 (1)		
II	469,667 µm (241,23-1172,61)	15 (9)	1 (1)	3
III	508,475 µm (184,47-738,65)	4 (3)		

PHP: Patrón histológico predominante. <sup>a</sup>Valores tomados de referencia de normalidad: 380-900 µm (461).

## 2. Estudio inmunohistoquímico

Para una mejor valoración de las diferentes estructuras testiculares se realizaron técnicas inmunohistoquímicas mediante el empleo de anticuerpos contra D2-40, CK8/18/19, inhibina, calretinina, colágeno IV, AMLA1A4, CD34, CD68 KP1, triptasa, receptor de andrógenos, receptor de estrógenos y receptor de progesterona. En 1 paciente con PHP III sólo se realizó la técnica de calretinina para el conteo de las células de Leydig, porque la pieza de orquiectomía bilateral estaba muy hialinizada. La **Tabla 31** recoge el número de pacientes en los que fueron valorables las técnicas inmunohistoquímicas.

En el resto de pacientes no pudieron valorarse, posiblemente por un fallo en la fijación.

**Tabla 31.** Número de pacientes en los que se valoraron las técnicas inmunohistoquímicas

Ac	n	Ac	n	Ac	n	Ac	n	Ac	n	Ac	n
D2-40	39	Calretinina	41	Colágeno IV	24	CD-34	35	Triptasa	37	RE	36
CK8/18/19	39	Inhibina	39	AML A1A4	38	CD-68	38	RA	37	RP	36

Ac: Anticuerpo, n: Número de pacientes.

## 2.1. Tubos seminíferos

### 2.1.1. Células germinales y epitelio seminífero

#### 2.1.1.1. D2-40 y CK8/18/19

Las células germinales no expresaron D2-40. Las células de Sertoli de los testículos con PHP I no expresaron D2-40, pero en el 49% de las pacientes (PHPs II y III) se observó expresión de D2-40 en células de Sertoli que revestían tubos atróficos, con espermatogénesis ausente o con parada de la maduración en espermatogonias. La expresión de D2-40 fue más intensa en los tubos más atróficos (**Tabla 32**).

**Tabla 32.** Número de pacientes que expresaron D2-40 en las células de Sertoli, según el patrón histológico predominante

PHP	Ausente (n)	Focal (n)	Parcheada (n)	Difusa (n)
I	4			
II <sup>a</sup>	15	6 (3 <sup>b</sup> y 3 <sup>c</sup> )	5 <sup>b</sup>	
III	1	4 <sup>b</sup>	3 (2 <sup>b</sup> y 1 <sup>c</sup> )	1 <sup>b</sup>

PHP: Patrón histológico predominante.

<sup>a</sup> 4 pacientes: patrón histológico secundario III.

<sup>b</sup> Espermatogénesis ausente.

<sup>c</sup> Parada en espermatogonias.

La CK8/18/19 no se expresó en ningún testículo con PHP I. En los testículos con PHPs II o III se observó expresión de CK8/18/19 en células de Sertoli de núcleo esférico o elongado, que revestían tubos atróficos similares

a los tubos hipoplásicos, sin espermatogénesis. Además, también se identificó la expresión de CK8/18/19 en células de Sertoli atróficas que revestían tubos ectásicos en testículos con PHP II. La expresión de CK8/18/19 se recoge en la **Tabla 33**.

**Tabla 33.** Expresión de CK8/18/19 a nivel de las células de Sertoli en las piezas de orquiectomía bilateral de las pacientes, según el patrón histológico predominante

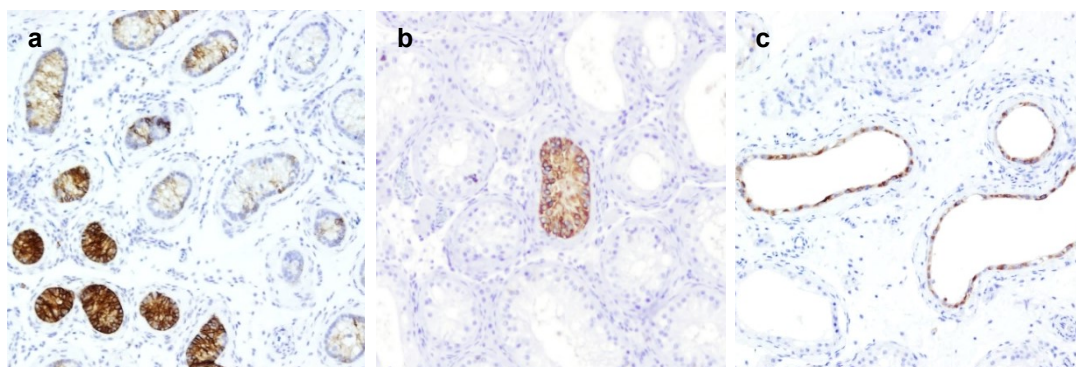
PHP	Ausente (n)	Focal (n)	Parcheada (n)	Difusa (n)
I	4			
II	22	5 (2 <sup>a</sup> y 3 <sup>b</sup> )	1 <sup>b</sup>	
III	6	1 <sup>a</sup>		

PHP: Patrón histológico predominante.

<sup>a</sup> Células de Sertoli de núcleo esférico o elongado que revestían tubos atróficos similares a tubos hipoplásicos.

<sup>b</sup> Epitelio seminífero atrófico que revestía tubos ectásicos.

La **Figura 23** muestra la expresión de D2-40 y de CK8/18/19 en las células de Sertoli.



**Fig. 23.** Expresión de D2-40 y de CK8/18/19 en las células de Sertoli

**23a)** Expresión de D2-40 en células de Sertoli que revisten tubos seminíferos atróficos similares a tubos hipoplásicos (muy intensa) y tubos con sólo células de Sertoli (menor intensidad).

**23b)** Expresión focal de CK8/18/19 en un tubo seminífero atrófico similar a un tubo hipoplásico, sin espermatogénesis.

**23c)** Tubos seminíferos ectásicos revestidos por un epitelio seminífero atrófico que expresa CK8/18/19.

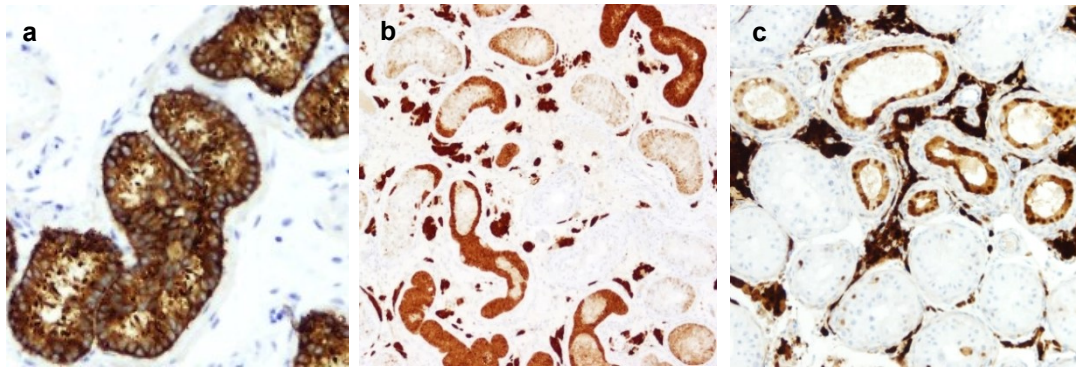
#### 2.1.1.2. Inhibina y calretinina

En todas las pacientes con la técnica inmunohistoquímica de inhibina se observó una tinción citoplasmática difusa en las células de Sertoli. Además, el 69% de las pacientes (PHPs II y III) mostraron expresión en los denominados

cuerpos de inhibina en células de Sertoli que revestían tubos atróficos similares a tubos hipoplásicos, sin espermatogénesis o con parada de la maduración en espermatogonias (**Fig. 24a**).

Se observó expresión de calretinina en células de Sertoli que revestían tubos atróficos similares a tubos hipoplásicos en testículos con PHPs II o III. La expresión de calretinina fue más intensa en los tubos más atróficos (**Fig. 24b**).

También expresaron calretinina células de Sertoli atróficas que revestían tubos seminíferos ectásicos en testículos con PHPs I y II (**Fig. 24c**).



**Fig. 24.** Expresión de cuerpos de inhibina y calretinina en las células de Sertoli

**24a)** Tubos hipoplásicos revestidos por células de Sertoli que expresan cuerpos de inhibina en el polo apical de su citoplasma.

**24b)** Expresión de calretinina en tubos seminíferos atróficos similares a hipoplásicos. La intensidad de la tinción es mayor en los tubos más atróficos.

**24c)** Tubos ectásicos revestidos por un epitelio seminífero atrófico que expresa calretinina.

Las **Tablas 34** y **35** recogen la expresión de cuerpos de inhibina y de calretinina, respectivamente.

**Tabla 34.** Expresión de cuerpos de inhibina en las células de Sertoli, según el patrón histológico predominante

PHP	Ausentes (n)	Focales (n)	Parcheados (n)	Difusos (n)
I	4			
II	8	9 <sup>a</sup> (5 <sup>b</sup> y 4 <sup>c</sup> )	7 <sup>a</sup> (5 <sup>b</sup> y 2 <sup>c</sup> )	2 <sup>a</sup> (2 <sup>b</sup> )
III		1 <sup>c</sup>	1 <sup>b</sup>	7 (1 <sup>b</sup> y 6 <sup>c</sup> )

PHP: Patrón histológico predominante.

<sup>a</sup> 7 pacientes tenían un patrón histológico secundario III (2: cuerpos de inhibina difusos, 3: parcheados y 2: focales).

<sup>b</sup> Parada en espermatogonias.

<sup>c</sup> Espermatogénesis ausente.

**Tabla 35.** Expresión de calretinina en las células de Sertoli, según el patrón histológico predominante

PHP	Ausente (n)	Focal (n)	Parcheada (n)	Difusa (n)
I	2	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	
II	7	2 <sup>a</sup> ; 8 <sup>b</sup> (5 <sup>c</sup> y 3 <sup>d</sup> )	2 <sup>a</sup> ; 3 <sup>a</sup> y <sup>b</sup> (2 <sup>c</sup> y 1 <sup>d</sup> ) y 6 <sup>b</sup> (5 <sup>c</sup> y 1 <sup>d</sup> )	
III	2	5 <sup>b</sup> (2 <sup>c</sup> y 3 <sup>d</sup> )	1 <sup>b</sup> ( <sup>d</sup> )	1 <sup>b</sup> ( <sup>c</sup> )

PHP: Patrón histológico predominante.

<sup>a</sup> Epitelio seminífero atrófico que revestía tubos ectásicos.

<sup>b</sup> Células de Sertoli que revestían tubos atróficos similares a los hipoplásicos.

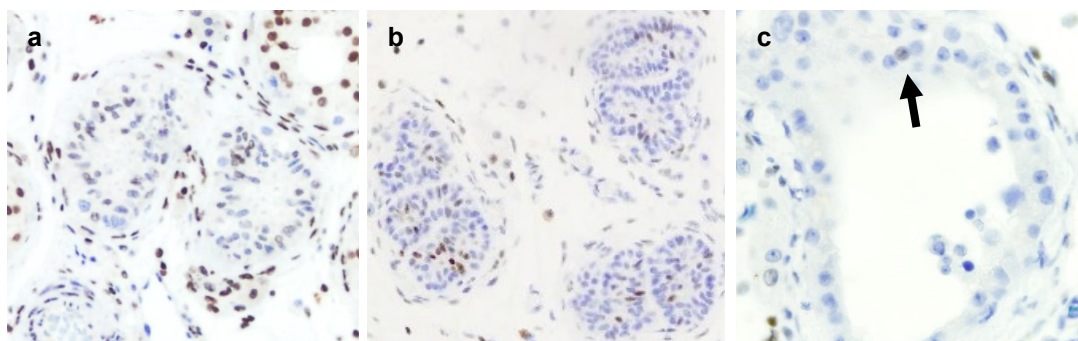
<sup>c</sup> Parada en espermatogonias.

<sup>d</sup> Espermatogénesis ausente.

### 2.1.1.3. Receptor de andrógenos y de progesterona

En todos los testículos con PHP I las células de Sertoli expresaron el receptor de andrógenos de forma difusa en el núcleo, pero en el 30% de las pacientes se observó una pérdida de expresión nuclear en testículos con PHPs II o III (**Fig. 25a**).

El 11% de las pacientes expresaron el receptor de progesterona en células de Sertoli con núcleo esférico o elongado, que revestían tubos seminíferos sin células germinales (**Fig. 25b**) y en 1 paciente (PHP II) se observó expresión focal débil del receptor de progesterona en aisladas células de Sertoli atróficas en tubos seminíferos ectásicos (**Fig. 25c**).



**Fig. 25.** Expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en las células de Sertoli

**25a)** Pérdida de la expresión del receptor de andrógenos en células de Sertoli atróficas que revisten tubos hipoplásicos.

**25b)** Expresión del receptor de progesterona en células de Sertoli atróficas que revisten tubos atróficos similares a tubos hipoplásicos.

**25c)** Tubo seminífero ectásico revestido por un epitelio atrófico. La flecha señala expresión débil y focal del receptor de progesterona.

La **Tabla 36** recoge la expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en las células de Sertoli.

**Tabla 36.** Expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en las células de Sertoli, según el patrón histológico predominante

PHP	Receptor de andrógenos <sup>a</sup> (n)				Receptor de progesterona (n)			
	A	F	P	D	A	F	P	D
I				4	4			
II		1	4	19	21	3		
III	3	2	1	3	6	1	1	

PHP: Patrón histológico predominante, A: ausente, F: focal, P: parcheada, D: difusa.

<sup>a</sup> La espermatogénesis en los tubos revestidos por células de Sertoli que mostraron pérdida de la expresión nuclear del receptor de andrógenos fue variable (5: ausente, 5: parada de la maduración en espermatogonias y 1: parada de la maduración en espermátidas redondas).

## 2.1.2. Pared tubular

### 2.1.2.1. Colágeno IV, actina y CD34

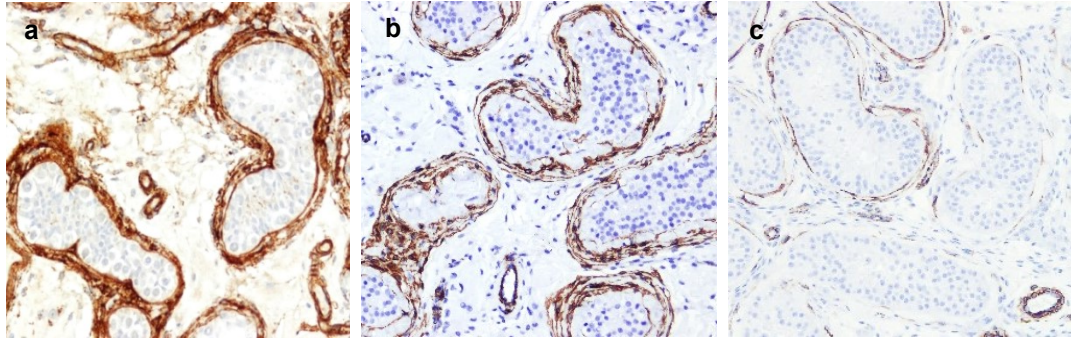
Con la técnica de colágeno IV se observó que el engrosamiento de la pared tubular era a expensas preferentemente de colágeno IV (**Fig. 26a**).

En el 33% de las pacientes se identificó un patrón de expresión de actina hojaldrado (**Fig. 26b**). Además, en el 55% de las pacientes disminuyó el número de capas de miofibroblastos y en el 84% de las pacientes se



observaron zonas sin miofibroblastos o con miofibroblastos con una distribución discontinua (**Fig. 26c**).

Los miofibroblastos fueron sustituidos por fibroblastos CD34+ en el 74% de las pacientes (**Fig. 26d y 26e**).

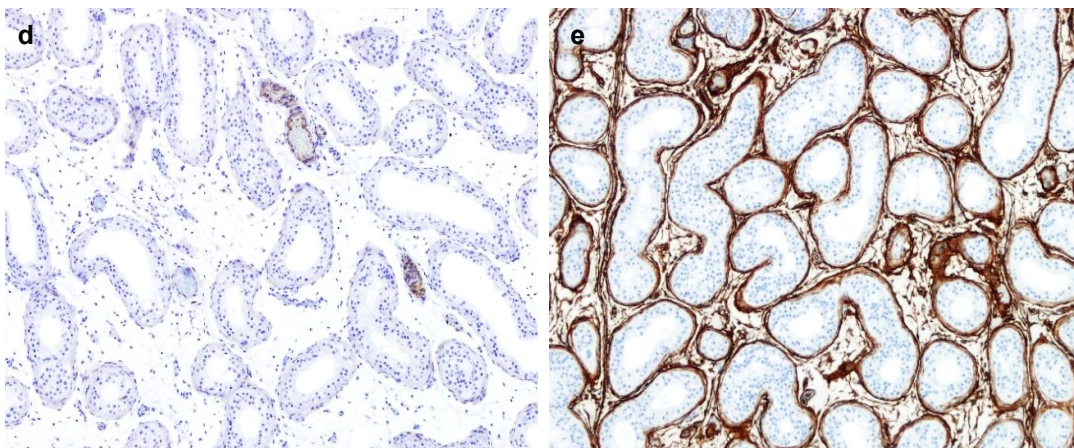


**Fig. 26.** Expresión de Colágeno IV, actina y CD34 en la pared tubular

**26a)** Tubos hipoplásicos con paredes hialinizadas con aumento del depósito de colágeno IV.

**26b)** Expresión de actina en los miofibroblastos de la pared tubular con un patrón hojaldrado.

**26c)** Pared tubular con disminución del número de capas de miofibroblastos, que expresan actina de forma discontinua y parcheada.



**26d)** Perdida difusa de la expresión de actina en la pared tubular.

**26e)** Sustitución de los miofibroblastos por fibroblastos CD34+ (Fig.26d. y 26e pertenecen a la misma paciente).

La expresión de actina en la pared tubular se recoge en la **Tabla 37**.

**Tabla 37.** Expresión de actina en la pared tubular, según el patrón histológico predominante

PHP	Patrón de expresión <sup>a</sup> (n)				Expresión (n)			
	3 capas paralelas internas (difusa y continua)	Hojaldrada	2 capas	1 capa	C	F	P	D
I	2		1	1	2		1	1
II	3	13	5	7	4	11 (2 <sup>b</sup> )	6	4
III		1	5	2		2 <sup>b</sup>	6	1

PHP: Patrón histológico predominante.

C: Conservada continua. Pérdida de expresión y discontinuidad: F: focal, P: parcheada, D: difusa.

<sup>a</sup> En 1 paciente no se pudo valorar el patrón de expresión porque la tinción fue difusamente negativa (PHP III).

<sup>b</sup> Pérdida de la expresión de actina en tubos seminíferos atróficos similares a tubos hipoplásicos.

La expresión de CD34 observada en la pared de los tubos seminíferos no hialinizados se recoge en la **Tabla 38**.

**Tabla 38.** Expresión de CD34 en la pared tubular, según el patrón histológico predominante

PHP	2-3 capas más externas de forma difusa (n)	Su expresión aumentó en paralelo a la pérdida de expresión de actina		
		↑focal (n)	↑parcheado (n)	↑difuso (n)
I	2		1	1
II	7	7	7	1
III		3	5	1

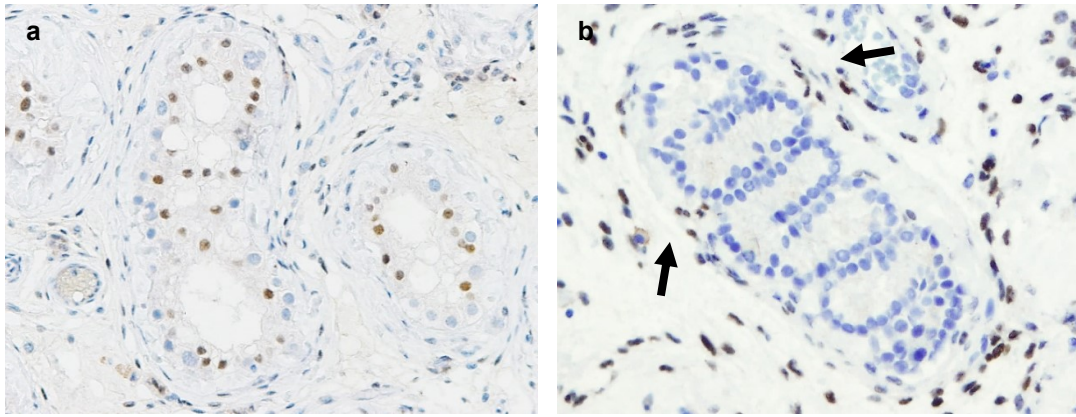
PHP: Patrón histológico predominante.

#### 2.1.2.2. Receptor de andrógenos y de progesterona

La expresión del receptor de andrógenos en la pared tubular fue muy variable, pero estuvo ausente en 3 pacientes con PHP III y en 4 pacientes sólo se observó expresión focal (**Fig. 27a**).

En el 22% de las pacientes se observó expresión del receptor de progesterona en la pared tubular (**Fig. 27b**; PHPs II o III).





**Fig. 27.** Expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en la pared tubular

**27a)** Tubos seminíferos con patrón histológico II con pérdida de la expresión del receptor de andrógenos en la pared tubular.

**27b)** Expresión del receptor de progesterona en la pared tubular de un tubo hipoplásico.

La **Tabla 39** recoge la expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en la pared tubular.

**Tabla 39.** Expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en la pared tubular, según el patrón histológico predominante

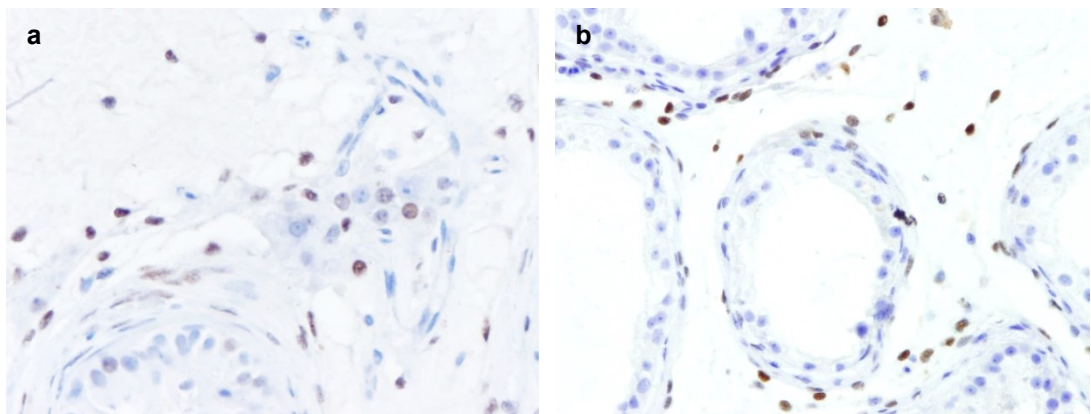
PHP	Receptor de andrógenos (n)				Receptor de progesterona (n)			
	A	F	P	D	A	F	P	D
I		1	3		4			
II		2	18	4	17	4	2	
III	3	1	4	1	7		2	

PHP: Patrón histológico predominante. A: ausente, F: focal, P: parcheada, D: difusa.

## 2.2. Intersticio

### 2.2.1. Células estromales CD34+

Todas las pacientes expresaron el receptor de andrógenos en las células estromales CD34+, aunque en proporción variable (**Fig. 28a**). También en el 83% de las pacientes las células estromales CD34+ expresaron el receptor de progesterona (**Fig. 28b**).



**Fig. 28.** Expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en las células estromales CD34+

**28a)** Expresión del receptor de andrógenos en células estromales CD34+ y en células de Leydig. Las células de Sertoli muestran núcleos elongados y pérdida de expresión.

**28b)** Expresión del receptor de progesterona en células estromales CD34+.

La **Tabla 40** recoge la expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en las células estromales CD34+.

**Tabla 40.** Expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en las células estromales CD34+, según el patrón histológico predominante

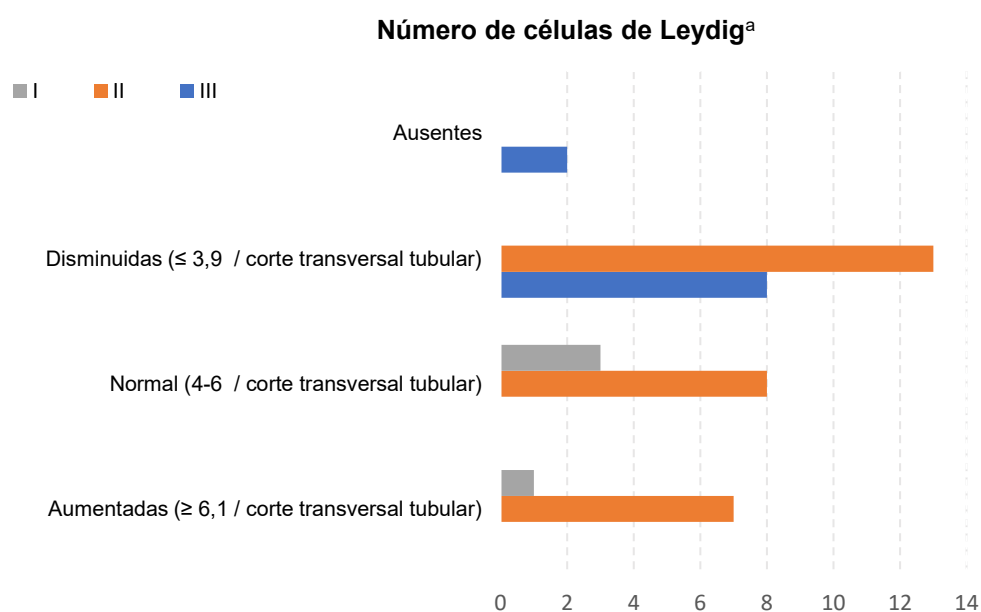
PHP	Receptor de andrógenos (n)				Receptor de progesterona (n)			
	A	F	P	D	A	F	P	D
I		1	3			2	2	
II		1	15	8	6	6	9	2
III		3	5	1			9	

PHP: Patrón histológico predominante. A: ausente, F: focal, P: parcheada, D: difusa.

## 2.2.2. Células de Leydig

### 2.2.2.1. Inhibina y calretinina

En todas las pacientes las células de Leydig presentes mostraron una tinción citoplasmática difusa con inhibina, y citoplasmática y nuclear difusa con calretinina. Con la ayuda de la técnica de calretinina se realizó el conteo de las células de Leydig (**Fig. 29**).



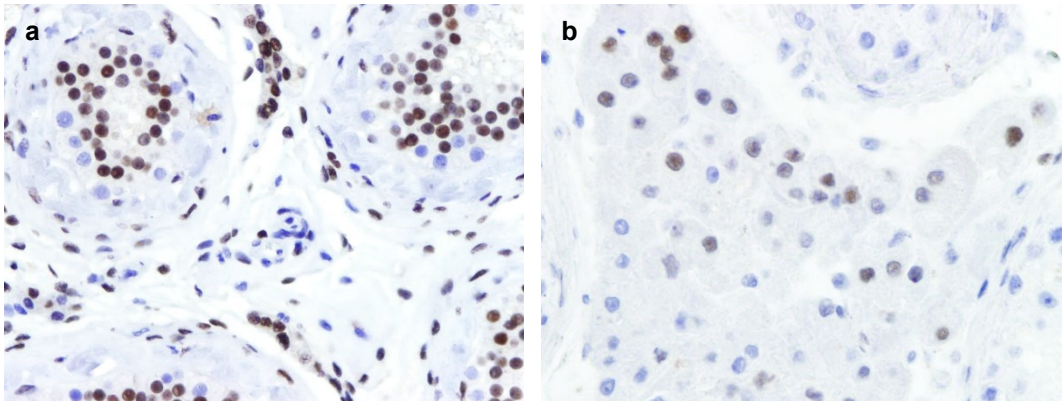
<sup>a</sup> En 1 paciente sólo se pudo realizar el estudio morfológico (patrón histológico II: células de Leydig aumentadas).

**Fig. 29.** Cantidad de células de Leydig intersticiales en las pacientes, según el patrón histológico predominante

En 3 pacientes con PHP II y en 1 paciente con PHP III se identificaron células de Leydig intratubulares con la técnica inmunohistoquímica de calretinina (en 2 pacientes, con PHPs II y III, se observaron en tubos completamente hialinizados).

2.2.2.2. Receptor de andrógenos y de progesterona

Las células de Leydig expresaron el **receptor de andrógenos** en todas las pacientes, cuando estuvieron presentes, pero la proporción de células que lo expresaron fue mayor en las pacientes con PHP II o III (**Fig. 30a**). El 50% de las pacientes también expresaron el **receptor de progesterona** en las células de Leydig (**Fig. 30b**).



**Fig. 30.** Expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en las células de Leydig

**30a)** Expresión del receptor de andrógenos en dos grupos de células de Leydig. También se observa su expresión en células de Sertoli de núcleo esférico, en la pared tubular y en células estromales CD34+.

**30b)** Expresión parcheada del receptor de progesterona en las células de Leydig.

La expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en las células de Leydig se recoge en la **Tabla 41**.

**Tabla 41.** Expresión del receptor de andrógenos y de progesterona en las células de Leydig, según el patrón histológico predominante

PHP	Receptor de andrógenos <sup>a</sup> (n)				Receptor de progesterona <sup>b</sup> (n)			
	A	F	P	D	A	F	P	D
I		1	3		2	2		
II		2	12	9	10	5	4	
III				3	1	1	1	

PHP: Patrón histológico predominante. A: ausente, F: focal, P: parcheada, D: difusa.  
<sup>a</sup> En 7 pacientes (1: PHP II y 6: PHP III) el número de células de Leydig se consideró insuficiente para su valoración.  
<sup>b</sup> En 10 pacientes (4: PHP II y 6: PHP III) el número de células de Leydig se consideró insuficiente para su valoración.

### 2.2.3. Macrófagos

#### 2.2.3.1. CD68

Con la ayuda del CD68 se realizó el conteo de los macrófagos intersticiales y peritubulares y se registró el número de pacientes en los que se observaron macrófagos intratubulares (**Tabla 42**). El valor tomado de referencia de normalidad para el conteo de macrófagos intersticiales fue:  $\leq 0,5$  /tubo (461).

**Tabla 42.** Promedio (rango) de macrófagos intersticiales y peritubulares por tubo y número de pacientes que mostraron macrófagos intratubulares, según el patrón histológico

PHP	Promedio (rango) de macrófagos intersticiales/tubo	Pacientes con > 0,5 macrófagos intersticiales/tubo (n)	Promedio (rango) de macrófagos peritubulares/tubo	Macrófagos intratubulares (n)
I	0,491 (0,012-0,734)	3	0,053 (0-0,137)	1
II	0,867 (0,283-2,1)	17	0,118 (0-0,468)	11
III	0,554 (0,130-0,982)	4	0,161 (0-0,643)	4

PHP: Patrón histológico predominante.

#### 2.2.3.2. Relación células de Leydig/macrófagos

En el 78% de las pacientes la relación células de Leydig/macrófagos estuvo alterada e incluso en el 19% de las pacientes el número de macrófagos intersticiales fue mayor que el número de células de Leydig intersticiales (**Tabla 43**).

**Tabla 43.** Número de pacientes con alteración de la relación células de Leydig/macrófagos, según el patrón histológico predominante

PHP	Pacientes con n.º de macrófagos > n.º de células de Leydig (n)		Pacientes con n.º de células de Leydig > n.º de macrófagos, pero <10 células de Leydig/macrófago (n)	
	Intersticiales	Peritubulares	Intersticiales	Peritubulares
I			2 <sup>a</sup>	
II	2	1	16 <sup>a</sup>	3
III	5	3	4	3

PHP: Patrón histológico predominante.

<sup>a</sup> En 8 pacientes la relación células de Leydig/macrófagos estuvo alterada a pesar de una cantidad normal (5 pacientes) o aumentada (3 pacientes) de células de Leydig.

### 2.2.4. Mastocitos

Con la técnica de **triptasa** se observaron mastocitos intratubulares en 10 pacientes y se realizó el conteo de mastocitos (**Tabla 44**). Los valores tomados de referencia de normalidad para el conteo de mastocitos fueron: 1,14-1,94 /tubo (462).

**Tabla 44.** Número de pacientes con mastocitos intratubulares y conteo de mastocitos, según el patrón histológico predominante

PHP	Pacientes con mastocitos intratubulares (n)	Promedio (rango) de mastocitos intersticiales/tubo	Promedio (rango) de mastocitos peritubulares/tubo
I	1	0,707 (0,485-0,929)	0,661 (0,487-0,833)
II	6	0,659 (0,202-1,033)	0,262 (0,034-0,634)
III	3	0,355 (0,157-0,675)	0,097 (0,027-0,208)

PHP: Patrón histológico predominante.

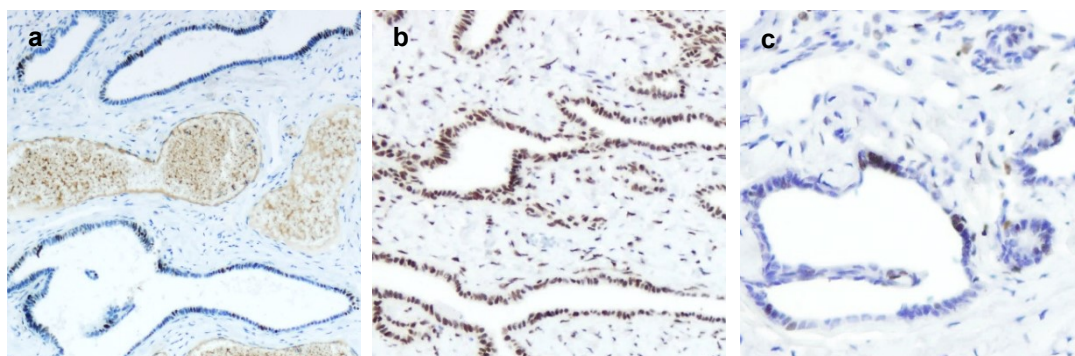
## 2.3. Vías espermáticas

### 2.3.1. Rete testis

#### 2.3.1.1. Receptor de estrógenos, andrógenos y progesterona

La expresión del receptor de estrógenos y de andrógenos en el epitelio de la rete testis fue variable, pero se expresaron en PHPs histológicos predominantes II o III (**Fig. 31a y 31b**, respectivamente).

La expresión del receptor de progesterona en el epitelio de la rete testis fue variable, pero en el 48% de las pacientes se observó expresión focal (**Fig. 31c**).



**Fig. 31.** Expresión del receptor de estrógenos, andrógenos y progesterona en la rete testis

**31a)** Cavidades de la rete testis mediastínica revestidas por un epitelio que expresa el receptor de estrógenos de forma parcheada.

**31b)** Expresión difusa del receptor de andrógenos en el epitelio de la rete testis mediastínica.

**31c)** Expresión focal del receptor de progesterona en el epitelio de la rete testis mediastínica.

La **Tabla 45.** recoge la expresión del receptor de estrógenos, andrógenos y progesterona en el epitelio de la rete testis.

**Tabla 45.** Expresión del receptor de estrógenos, andrógenos y progesterona en el epitelio de la rete testis, según el patrón histológico predominante

PHP	Receptor de estrógenos (n)				Receptor de andrógenos (n)				Receptor de progesterona (n)			
	A	F	P	D	A	F	P	D	A	F	P	D
I <sup>a</sup>	1	2			1		2			1	2	
II <sup>b,d</sup>	1	11	8			2	9	9	6	10	2	
III <sup>c</sup>	1	1	5		1	2	1	4	4	3	1	

PHP: Patrón histológico predominante. A: ausente, F: focal, P: parcheada, D: difusa.

<sup>a</sup> Rete testis ausente en 1 paciente.

<sup>b</sup> Rete testis ausente en 4 pacientes (receptor de estrógenos y receptor de andrógenos).

<sup>c</sup> Rete testis ausente en 1 paciente.

<sup>d</sup> Rete testis ausente en 5 pacientes con patrón histológico predominante II (receptor de progesterona).

## 2.3.2. Epidídimo

### 2.3.2.1. Receptor de estrógenos y andrógenos

En todas las pacientes el **receptor de estrógenos** se expresó de forma parcheada o difusa (**Fig. 32a**) en el epitelio de los conductillos eferentes.

El 78% de las pacientes también expresaron el receptor de estrógenos en el epitelio del conducto principal del epidídimo, 20 pacientes en la porción



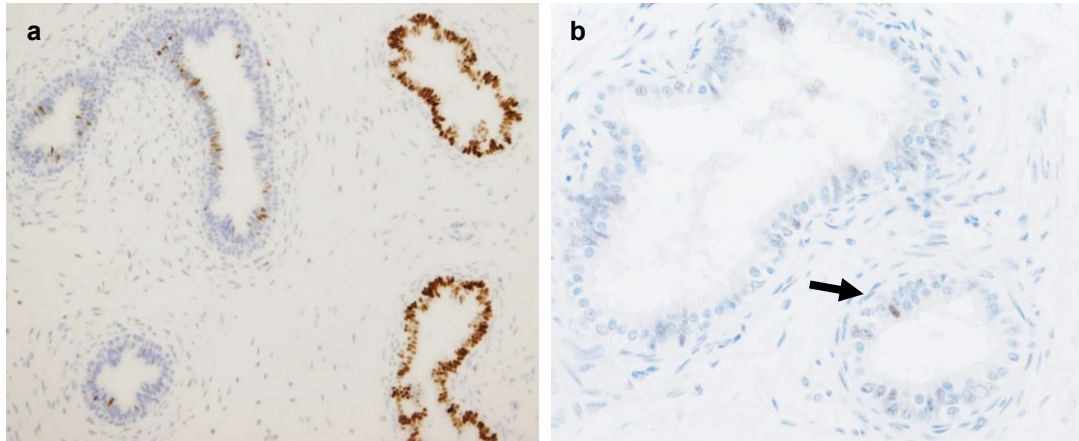
proximal (**Fig. 32a**) y 2 pacientes con PHP II en una porción más distal del cuerpo. Sólo mostró expresión focal del receptor de estrógenos en el epitelio el conducto principal del epidídimo 1 paciente con PHP I.

La expresión del **receptor de andrógenos** en el epitelio de los conductillos eferentes fue variable, pero en todas las pacientes con PHP III fue focal (**Fig. 32b**) o parcheada.

En todos los testículos con PHP I se observó expresión difusa del receptor de andrógenos en el epitelio del conducto principal del epidídimo, pero en 5 pacientes con PHPs II y III se observó una pérdida de expresión a este nivel (**Fig. 32c**).

La expresión del receptor de andrógenos en las células musculares de la pared del epidídimo fue variable, pero se observó una menor expresión en los testículos con PHP III (**Fig. 32d**).

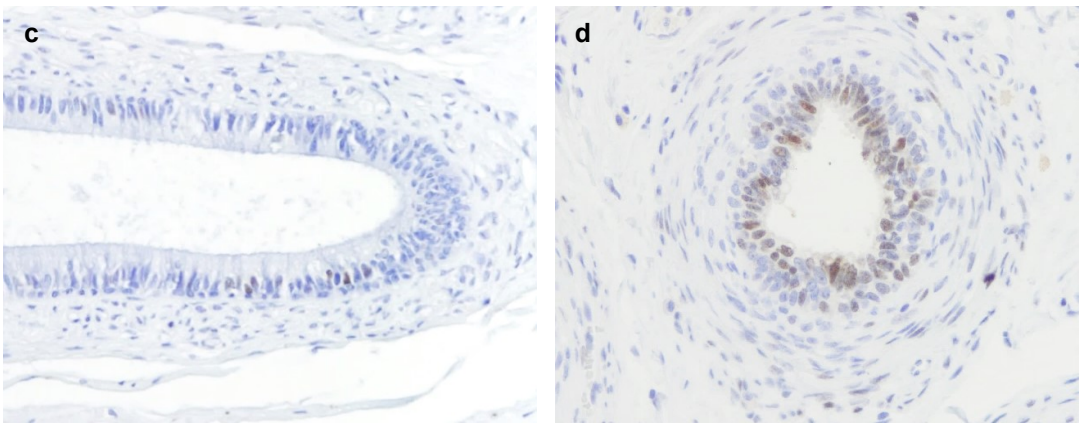




**Fig. 32.** Expresión del receptor de estrógenos y andrógenos en el epidídimo

**32a)** Expresión difusa del **receptor de estrógenos** en el epitelio de los conductillos eferentes y focal en las células principales de la porción inicial del conducto principal del epidídimo.

**32b)** Expresión aislada del **receptor de andrógenos** en el epitelio de los conductillos eferentes.



**32c)** Expresión focal del **receptor de andrógenos** en células principales del conducto principal del epidídimo.

**32d)** Corte transversal del conducto principal del epidídimo. El **receptor de andrógenos** se expresa en el epitelio, pero no se observa su expresión en la pared muscular

La expresión del receptor de estrógenos y de andrógenos en el epidídimo se recoge en la **Tabla 46**.

**Tabla 46.** Expresión del receptor de estrógenos y de andrógenos en el epidídimo, según el patrón histológico predominante

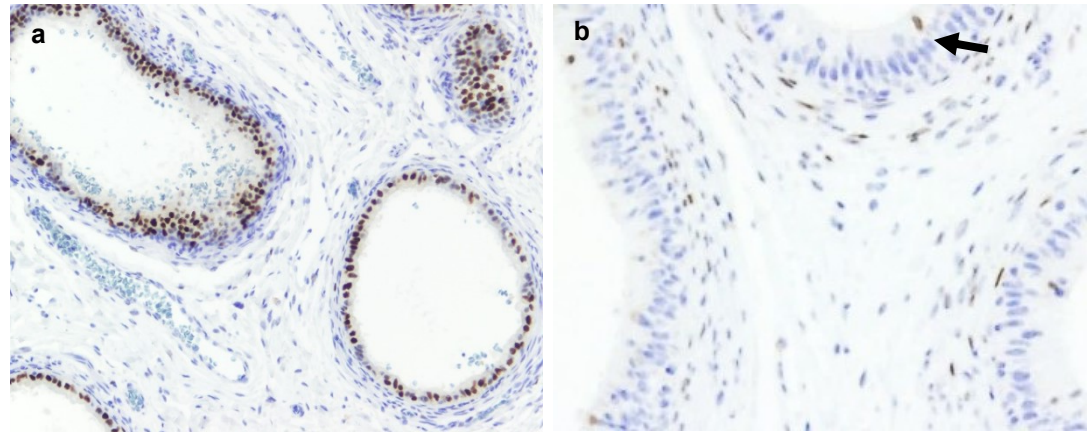
PHP	Epitelio																Células musculares			
	Receptor de estrógenos (n)								Receptor de andrógenos (n)											
	Conductillos eferentes				Conducto principal				Conductillos eferentes				Conducto principal				Epidídimo			
	A	F	P	D	A	F	P	D	A	F	P	D	A	F	P	D	A	F	P	D
I			2	2	3	1			1		1	2				4	2	1	1	
II <sup>a,c</sup>			7	12	2	17				3	12	2		1		17	6	4	14	
III <sup>b,d</sup>			3	4	1	4				2	6		1		3	2	6	2		

PHP: Patrón histológico predominante. A: ausente, F: focal, P: parcheada, D: difusa.  
<sup>a</sup> Receptor de estrógenos: estructuras ausentes en 11 pacientes (5: conductillos eferentes y 6: conducto principal).  
<sup>b</sup> Receptor de estrógenos: estructuras ausentes en 3 pacientes (1: conductillos eferentes y 2: conducto principal).  
<sup>c</sup> Receptor de andrógenos: estructuras ausentes en 13 pacientes (7: conductillos eferentes y 6: conducto principal).  
<sup>d</sup> Receptor de andrógenos: estructuras ausentes en 4 pacientes (1: conductillos eferentes y 3: conducto principal).

2.3.2.2. Receptor de progesterona

En todas las pacientes la expresión de progesterona fue parcheada o difusa (**Fig. 33a**) en el epitelio de los conductillos eferentes y ausente o focal (**Fig. 33b**) en las células principales del conducto principal del epidídimo.

La expresión del receptor de progesterona en la pared muscular del epidídimo fue focal o parcheada (**Fig. 33b**) en el 75% de las pacientes, pero en 9 pacientes no se observó expresión a este nivel (PHPs I y II).



**Fig. 33.** Expresión del receptor de progesterona en el epidídimo

**33a)** Expresión difusa del receptor de progesterona en el epitelio de un grupo de conductillos eferentes dilatados con pérdida del festoneado interno.

**33b)** Expresión del receptor de progesterona aislada en el epitelio del conducto principal del epidídimo (flecha) y parcheada en la pared muscular.

La **Tabla 47** recoge la expresión del receptor de progesterona en el epidídimo.

**Tabla 47.** Expresión del receptor de progesterona en el epidídimo, según el patrón histológico predominante

PHP	Epitelio								Pared muscular del epidídimo			
	Conductillos eferentes				Conducto epididimario							
	(n)				(n)				(n)			
A	F	P	D	A	F	P	D	A	F	P	D	
I			3	1	3	1			2	1	1	
II <sup>a</sup>			9	8	10	6			7	9	7	
III <sup>b</sup>			5	3	4	3				2	7	

PHP: Patrón histológico predominante. A: ausente, F: focal, P: parcheada, D: difusa.

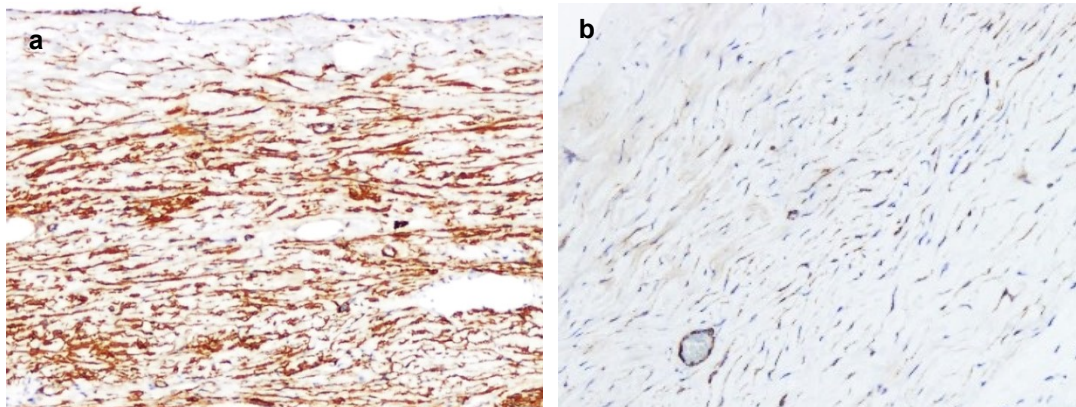
<sup>a</sup> Estructuras ausentes en 13 pacientes (6: conductillos eferentes y 7: conducto epididimario).

<sup>b</sup> Estructuras ausentes en 3 pacientes (1: conductillos eferentes y 2: conducto epididimario).

## 2.4. Albugínea

### 2.4.1. Actina

En el 89% de las pacientes los miofibroblastos de la albugínea expresaron actina (**Fig. 34a**), pero en 4 pacientes se observó una pérdida de expresión (**Fig. 34b**).



**Fig. 34.** Expresión de actina en los miofibroblastos de la albugínea

**34a)** Expresión conservada de actina en los miofibroblastos de la albugínea.

**34b)** Pérdida de la expresión de actina en la albugínea.

La **Tabla 48** recoge la expresión de actina observada en la albugínea.

**Tabla 48.** Expresión de actina en la albugínea, según el patrón histológico predominante

PHP	Conservada (n)	Pérdida de expresión de actina		
		Focal (n)	Parcheada (n)	Difusa (n)
I	4			
II <sup>a</sup>	23	1		
III	6	1	1	1

PHP: Patrón histológico predominante.

<sup>a</sup> Albugínea ausente en 1 paciente.

La **Tabla 49** resume los hallazgos morfológicos e inmunohistoquímicos.

**Tabla 49.** Hallazgos morfológicos e inmunohistoquímicos más importantes, de más a menos frecuentes

Hallazgo Estructura	Atrofia/ hipertrofia/ y/o hipoplasia/ hiperplasia	Células inflamato- rias	Vacuolas	Dila- tación/ colapso	Ca <sup>2+</sup>	↑ lipofucsina	Metapla- sia epitelial	Apop- tosis
<u>Tubos seminíferos</u>		X		X	X			
Células de Sertoli	X		X					
Células germinales	X		X					X
Pared tubular	X	X						
<u>Intersticio</u>	X	X						
Células estromales CD34+	X							
Células de Leydig	X		X			X		
Macrófagos	X							
Mastocitos	X							
Rete testis	X		X	X			X	
Epidídimo	X	X	X	X	X	X		
<u>Túnica vaginal</u>		X	X		X		X	
<u>Estructuras vasculares</u>		X		X	X			
<u>Albugínea</u>	X							

### 3. Terapia hormonal

#### 3.1. Tipos de tratamientos

Todas las pacientes previamente a la intervención quirúrgica recibieron terapia hormonal cruzada. 41 pacientes recibieron tratamiento con estrógenos y antiandrógenos y 1 paciente exclusivamente con estrógenos. La terapia hormonal fue heterogénea (19 combinaciones de fármacos si tenemos en cuenta las posologías) y 7 fue el número máximo de pacientes que recibieron la misma combinación de fármacos a idéntica posología (**Tabla 50**).

**Tabla 50.** Resumen de los diferentes tratamientos hormonales recibidos por las pacientes

Tratamiento	Nombre comercial y dosis	N.º de pacientes y posología
Estrógenos conjugados v.o.	Equin 0,6 mg	11 pac. 4 posologías ≠ (6:4/d., 3:6/d., 1:1/d., 1:3/d.)
Valerato de estradiol v.o.	Progynova 1mg	2 pac. 2/d.
	Meriestra 2 mg	15 pac. 2 posologías ≠ (8:1/d., 7:2/d.)
Estradiol transdérmico (parche)	Estraderm TTS 25 µg	2 pac. 2 posologías ≠ (1:2/s. y 1: 3/s.)
	Estraderm MTX 25 µg	1 pac. 2/s.
	Estraderm MTX 50 µg	4 pac. 2/s.
	Estraderm MTX 100 µg	2 pac. 2/s.
Evopad 100 µg		1 pac. 1/d.
Gel de estradiol hemihidrato	Oestraclin 60mg/100g	1 pac. 1/s.
Tratamiento combinado: Etinilestradiol+ acetato de ciproterona v.o.	Diane 35:0,035 mg de etinilestradiol+ 2 mg acetato de ciproterona	4 pac. 2 posologías ≠ (3:2/d. y 1: 1/d.)
Acetato de ciproterona v.o.	Androcur 50 mg	38 pac. 2 posologías ≠ (4:1/d., resto: 2/d.)
Flutamida v.o. + análogo de GnRH I.M.	Eulexin 250 mg + Decapeptyl 11,25 mg I.M.	1 pac. 1/d.+ 1 vial/3 m.

v.o.: vía oral, I.M.: intramuscular, pac.: paciente, d.: día, s.: semana, m.: mes y ≠: diferentes.

### 3.1.1. Relación entre tratamiento y patrón histológico

En la **Tabla 51** se recoge el PHP observado según la dosis de tratamiento.

**Tabla 51.** Patrón histológico predominante según el tratamiento administrado

Tratamientos <sup>a</sup>	PHP (n)		
	I	II	III
Equin 0,6 mg: (+ Androcur 50 mg 2/d.)  1/d. 6/d.		1	
		2	1
Meriestra 2 mg: (+ Androcur 50 mg 1/d.)  1/d. 2/d.		1	
		2	
Meriestra 2 mg: (+ Androcur 50 mg 2/d.)  1/d. 2/d.	I	II	III
	1	6	
		4	2
Progynova 1mg 2/d. + Androcur 50 mg 2/d.			1
Progynova 1mg 2/d. + Eulexin 250 mg 1/d. + Decapeptyl 11,25 mg 1 vial/3 m.		1	
Estraderm TTS 25 µg: (+ Androcur 50 mg 2/d.)  2/s. 3/s.	I	II	III
		1 <sup>b</sup>	
	1 <sup>c</sup>		
Estraderm MTX 2/s: (+ Androcur 50 mg 2/d.)  25 µg 100 µg	I	II	III
		1	
			1
Evopad 100 µg 1/d. + Oestraclin 60mg/100g 1/s.		1	
Diane 35:  1/d. 2/d.  Diane 35 2/d. + Androcur 50 mg 1/d.	I	II	III
			1
		1 <sup>d</sup>	
	I	II	III
		1	1

PHP: Patrón histológico predominante.

<sup>a</sup> Sólo se recogen las dosis y/o posologías mínimas y máximas cuando hay varias para un mismo fármaco.

<sup>b</sup> Duración del tratamiento: 3 años.

<sup>c</sup> Duración del tratamiento: 30 años.

<sup>d</sup> Patrón histológico secundario III.

### 3.2. Datos relevantes de la terapia hormonal

Otros datos relevantes de la terapia hormonal se recogen en la **Tabla 52**.

**Tabla 52.** Datos relevantes de la terapia hormonal

Edad media al inicio del tratamiento (rango)	26 años (11-58 años)
Duración media de la terapia hormonal (rango)	7 años (3-30 años)
Tratamiento previo (no referenciando)	1 paciente
Automedicación	10 pacientes
Adherencia terapéutica intermitente	2 pacientes
Tiempo de suspensión previo a la cirugía	41 pacientes: 2 meses 1 paciente: 1 mes

### 3.2.1. Datos relevantes de la terapia hormonal en relación con el patrón histológico predominante

Todas las pacientes con PHP I iniciaron el tratamiento antes de los 37 años (rango: 11-36; **Tabla 53**).

**Tabla 53.** Edad (expresada en años) a la que el paciente inició el tratamiento, en relación con el patrón histológico predominante

PHP	11-16 (n)	17-22 (n)	23-27 (n)	28-33 (n)	34-39 (n)	40-46 (n)	47-52 (n)	53-58 (n)
I	1	1	1		1			
II	2	14	3	4	2	2	1	
III	1	3	1	2	2			1

PHP: Patrón histológico predominante.

Todas las pacientes que mostraron un PHP III habían sido tratados durante 4-8 años (**Tabla 54**).

**Tabla 54.** Duración de la terapia hormonal (expresada en años), en relación con el patrón histológico predominante

PHP	3-6 (n)	7-10 (n)	11-14 (n)	15-18 (n)	19-22 (n)	23-25 (n)	26-30 (n)
I	1	1			1		1
II	18	5	2	2		1	
III	6	4					

PHP: Patrón histológico predominante.

La **Tabla 55** recoge otros datos relevantes de la terapia hormonal en relación con el PHP.



**Tabla 55.** Datos relevantes de la terapia hormonal, en relación con el patrón histológico predominante

PHP	Tratamiento previo no referenciado (n)	Automedicación (n)	Adherencia terapéutica intermitente (n)	Suspensión del tratamiento 1 mes antes de la cirugía (n)
I	1	1	1	1
II		7		
III		2	1	

PHP: Patrón histológico predominante.

### 3.3. Datos hormonales

#### 3.3.1. Datos hormonales en relación con el patrón histológico predominante

Los niveles de FSH y LH estuvieron disminuidos en el 77% y en el 87% de las pacientes, respectivamente.

Los niveles de estradiol estuvieron dentro de los valores de normalidad para mujer en el 77% de las pacientes, pero aumentados en el 42% de las pacientes si tomamos como referencia los valores de normalidad para el varón.

Sólo en 1 paciente los niveles de testosterona estuvieron en el límite bajo de los valores de referencia de normalidad del laboratorio para el varón.

Los niveles hormonales de las pacientes según el PHP se recogen en la **Tabla 56.**

**Tabla 56.** Niveles hormonales de las pacientes según el patrón histológico predominante

PHP <sup>a</sup>	FSH			LH			Estradiol (9 pacientes: ↓ ♀; 31: N ♀)			Testosterona		
	(n)			(n)			(n)			(n)		
	↓	N ♂	↑	↓	N ♂	↑	↓	N ♂	↑	↓	N ♂	↑
I	3			3			1	1	1	3		
II	19	7	1	23	4		3	13	11	26	1 <sup>b</sup>	
III	9	1		9		1	2	3	5	10		

PHP: Patrón histológico predominante.

N♂ y N♀: valores dentro del rango de normalidad del laboratorio para varón y mujer, respectivamente.

<sup>a</sup> La analítica se realizó meses antes de la cirugía (media: 28 meses, rango: 1-78) y se excluyeron 2 pacientes (PHP I: la analítica se realizó previamente al inicio del tratamiento y PHP II: suspensión del tratamiento el mes previo a la analítica).

<sup>b</sup> El conteo de células de Leydig estuvo disminuido y la analítica fue realizada 67 meses antes de la cirugía.



### 3.3.2. Datos hormonales en relación con el tratamiento

Las **Tablas 57 y 58** recogen los valores hormonales en relación con el tratamiento.

**Tabla 57.** Valores de FSH y LH en relación con el tratamiento hormonal

Tratamientos	Valores de FSH <sup>a</sup>			Valores de LH <sup>a</sup>		
	↓	N <sup>b</sup>	↑	↓	N <sup>c</sup>	↑
Equin 0,6 mg: (+ Androcur 50 mg 2/d.) 1/d.		2,26		1,09		
	<0,05- <0,10	5,78		<0,07- <0,10	2,92	
Meriestra 2 mg: (+Androcur 50 mg 1/d.) 1/d.	0,17			<0,10		
	<0,05			0,01		
Meriestra 2 mg: (+ Androcur 50 mg 2/d.) 1/d.	<0,05- 0,44	2,44		0,01- <0,10	2,14	
	0,13- 0,59	1,37		0,03- 1,11		
Progynova 1mg 2/d. + Androcur 50 mg 2/d.	0,10			0,02		
Progynova 1mg 2/d.+Eulexin 250mg 1/d. +Decapeptyl 11,25 mg 1 vial/3m.	0,20			0,11		
Estraderm TTS 25 µg: (+ Androcur 50 mg 2/d.) 2/s.		1,33		0,44		
	0,86			<0,07		
Estraderm MTX 2/s: (+ Androcur 50 mg 2/d.) 25 µg	0,94			0,12		
	0,15	2,28		0,01- 1,13		
Evopad 100 µg 1/d. + Oestraclin 60mg/100g 1/s.		3		0,81		
Diane 35 1/d.	<0,05			0		
	0,1			<0,07		
	<0,05- 0,70			0,01- 0,50		

<sup>a</sup> Para sintetizar y facilitar la visualización de los datos cuando más de dos pacientes recibieron el mismo tratamiento a idéntica posología únicamente se muestra el rango de los valores hormonales y sólo se muestran las dosis y/o posologías mínimas y máximas. Se excluyen dos pacientes por los motivos mencionados previamente.

<sup>b</sup> Valores de normalidad del laboratorio para FSH en el varón: 0,95-13,6 mUI/ml.

<sup>c</sup> Valores de normalidad del laboratorio para LH en el varón: 1,14-8,75 mUI/ml.

**Tabla 58.** Valores de estradiol y testosterona en relación con el tratamiento hormonal

Tratamientos	Valores de estradiol <sup>a</sup>			Valores de testosterona <sup>a</sup>		
	↓	N <sup>b</sup>	↑	↓	N <sup>c</sup>	↑
Equin 0,6 mg: (+ Androcur 50 mg 2/d.)						
1/d.			94	25		
6/d.		17-39	174,7	<14,4-82		
Meriestra 2 mg: (+Androcur 50 mg 1/d.)			149,6	38,6		
1/d.						
2/d.	10			<13		
Meriestra 2 mg: (+ Androcur 50 mg 2/d.)						
1/d.		19-43	48-137	<13-54,6		
2/d.		14-25	61-62	16,2-56,8	351,3	
Progynova 1mg 2/d. + Androcur 50 mg 2/d.		42		26,4		
Progynova 1mg 2/d.+Eulexin 250mg 1/d. +Decapeptyl 11,25 mg 1 vial/3m.		17		33,2		
Estraderm TTS 25 µg: (+ Androcur 50 mg 2/d.)			54,24	91,4		
2/s.						
3/s.	<10			30,1		
Estraderm MTX 2/s.: (+ Androcur 50 mg 2/d.)						
25 µg		15		<14,4		
100 µg			59-161	<14,4-107,6		
Evopad 100 µg 1/d. + Oestraclin 60mg/100g 1/s.			146	26,5		
Diane 35						
1/d.	<10			40,6		
2/d.	<10			25,5		
Diane 35 2/d. (+ Androcur 50 mg 1/d.)	<10	21		<13-13,2		

<sup>a</sup> Para sintetizar y facilitar la visualización de los datos cuando más de dos pacientes recibieron el mismo tratamiento a idéntica posología únicamente se muestra el rango de los valores hormonales y sólo se muestran las dosis y/o posologías mínimas y máximas. Se excluyen dos pacientes por los motivos mencionados previamente.

<sup>b</sup> Valores de normalidad del laboratorio para estradiol en el varón: 11-44 pg/ml.

<sup>c</sup> Valores de normalidad del laboratorio para testosterona en el varón: 300-900 ng/100 ml.

## ***DISCUSIÓN***

## **Discusión**

Los efectos de los estrógenos exógenos sobre el testículo y, en menor medida, el epidídimo, aunque escasamente, han sido previamente analizados. En el ser humano, los primeros estudios se basaron en el análisis de los cambios encontrados en las biopsias testiculares procedentes de pacientes con cáncer de próstata tratados con estrógenos (29). Más recientemente, han sido de utilidad para aumentar el conocimiento sobre las acciones de los estrógenos en el testículo el estudio de las piezas de orquitectomía procedentes de mujeres transgénero sometidas a cirugía de reasignación de género desde los años 80 (45,30) hasta la actualidad (31,32). El análisis de los efectos a nivel celular del exceso de estrógenos a largo plazo a través del estudio de las piezas de orquitectomía de estas pacientes puede ayudar a detectar otros efectos adversos de la terapia hormonal cruzada y posibles implicaciones patológicas de los estrógenos. Los estudios previos relativos la acción de los estrógenos sobre los testículos se centran fundamentalmente en el estudio de los tubos seminíferos y las células de Leydig. En el presente trabajo se han estudiado sistemáticamente todas las estructuras testiculares, incluyendo estructuras de la pared tubular, estructuras vasculares, células inflamatorias y la vía espermática tanto rete testis como epidídimo de 84 piezas de orquitectomía bilateral de 42 mujeres transgénero sometidas a tratamiento a largo plazo con estrógenos y antiandrógenos.

Nistal et al (31) definieron 3 patrones histológicos según el grado de maduración de los tubos seminíferos. En concordancia con lo descrito

previamente, en este estudio se han identificado tres **patrones histológicos** en función de la severidad de las lesiones, confirmando este hallazgo en un mayor número de pacientes. En el presente estudio sólo 4 pacientes mostraron predominantemente células de Sertoli con morfología nuclear propia del adulto (PHP I). En la mayoría de las pacientes (28) se observaron predominantemente células de Sertoli con núcleos esféricos con nucléolo central, equiparables a los propios de la etapa prepuberal (PHP II). En las 10 pacientes restantes las células de Sertoli mostraron mayoritariamente núcleos semejantes a los observados durante la etapa infantil, elongados con nucléolos ausentes o inconspicuos periféricos (PHP III). Estos patrones morfológicos indican una progresiva **desdiferenciación de las células de Sertoli**.

En nuestra serie el **volumen testicular** estuvo disminuido en el 77% de los testículos y el **DTM** en el 100% los testículos, con aumento del espacio intersticial. Estos hallazgos son concordantes con los de Sapino et al (457), que observaron atrofia testicular en mujeres transgénero tras la administración de estrógenos. Asimismo, Leavy et al (32) y Schulze (30) describieron una reducción del DTM en respuesta a la terapia hormonal en mujeres transgénero. En nuestro trabajo la disminución del DTM fue paralela a la severidad del PHP. La pérdida de la luz de los tubos seminíferos en respuesta a la administración de estrógenos, además de en el ser humano (31), también está descrita en animales (404). La reducción del volumen testicular medio y del DTM fue mayor cuanto más desdiferenciadas estaban las células de Sertoli. De igual modo, el número de tubos intensamente desdiferenciados semejantes a los tubos hipoplásicos del adulto, aislados y agregados, el

número de tubos con pérdida de la luz tubular, la pseudoestratificación nuclear en las células de Sertoli, el engrosamiento de la pared tubular y el espacio intertubular aumentaron en paralelo con el mayor PHP. Además, en el presente trabajo se hallaron otras alteraciones morfológicas en las células de Sertoli, como vacuolización citoplasmática en todos los testículos, cambios granulares en los PHP II y III y pseudoestratificación de los núcleos de las células de Sertoli en el 93% de los testículos.

En relación a la presencia y calidad de la **espermatogénesis**, los hallazgos encontrados en este trabajo fueron que el patrón de espermatogénesis más frecuente fue la presencia de solo espermatogonias. En el presente estudio todas las pacientes mostraron una espermatogénesis alterada, cuya severidad aumentó en paralelo al PHP. La espermatogénesis fue completa, aunque cuantitativamente anormal, en todas las piezas de orquiectomía con PHP I y ausente o con parada en espermatogonias en todas las piezas de orquiectomía con PHP III. En las piezas de orquiectomía con PHP II la espermatogénesis fue variable, pero lo más frecuente fue observar espermatogénesis incompleta con parada de la maduración en espermátocitos.

Además, se han identificado alteraciones morfológicas en las células germinales tales como espermátocitos descamados en la luz de los tubos seminíferos, espermatogonias hipertróficas y multinucleadas, megaloespermatocitos, espermátidas gigantes multinucleadas y frecuentes imágenes de apoptosis. El fallo en la espermatogénesis tras la administración de estrógenos ha sido previamente descrito. En modelos animales los estrógenos perturban la dinámica del citoesqueleto y de las uniones

intercelulares y alteran la espermiación y la espermiogénesis (62,97,98,436,463). La desdiferenciación de las células de Sertoli asimismo contribuye a las lesiones observadas, porque en condiciones fisiológicas secretan factores críticos para el correcto desarrollo de la espermatogénesis y de la espermiogénesis (464). Además, la hialinización de la pared tubular en respuesta a estrógenos (29,30) impide el transporte de otras moléculas (465) y la señalización celular (466) en el testículo, procesos esenciales para el correcto desarrollo de la espermatogénesis (467).

En relación a la **pared tubular**, el engrosamiento de la membrana basal (457) y de la pared tubular (30-32) ha sido previamente descrito en piezas de orquiectomía procedentes de pacientes sometidas a cirugía de reasignación de género tras recibir tratamiento hormonal a largo plazo. En el presente estudio se comprueba este engrosamiento de la pared tubular y se constata además que este aumento del espesor de la pared tubular y su hialinización es paralelo al PHP, en 1 caso de PHP I, en el 78% de los testículos con PHP II y en el 100% de los testículos con PHP III. Además de la desdiferenciación de las células de Sertoli, Nistal et al (31) también identificaron células mioides desdiferenciadas, en piezas de orquiectomía procedentes de pacientes adultas sometidas a cirugía de reasignación de género tras haber recibido terapia hormonal.

En el presente trabajo además de la desdiferenciación de las células de Sertoli antes indicada, en el estudio del **intersticio** también se ha constatado una **desdiferenciación de las células de Leydig** adultas, concordante con lo previamente indicado por Schulze (30) y Nistal et al (31). Además, hemos constatado que el grado de desdiferenciación de las células de Leydig

asimismo aumentó en paralelo con la severidad del PHP. En el 40% de las pacientes predominaban los núcleos con nucléolo en las células de Leydig y el 48% de las pacientes mostraron células de Leydig hipertróficas (PHPs I y II). Sin embargo, el 48% de las pacientes con PHPs II y III mostraron células de Leydig con escaso citoplasma y núcleos hipercromáticos e irregulares. Aunque se observó hiperplasia de células de Leydig en algunas pacientes con PHPs I o II, el número de células de Leydig disminuyó en paralelo a la desdiferenciación celular. En modelos experimentales en animales también se ha observado tanto el enlentecimiento de la regeneración de las células de Leydig (116) como la estimulación de su proliferación (439,440), tras la administración de estrógenos y en relación con la exposición a disruptores endocrinos con actividad estrogénica y antiandrogénica, respectivamente. En el ser humano, el efecto dual de los estrógenos sobre la proliferación/diferenciación de las células de Leydig ha sido descrito previamente en pacientes con cáncer de próstata (29) y en mujeres transgénero sometidas a cirugía de reasignación de género tras recibir tratamiento hormonal (30,32,456,457).

El fallo de la espermatogénesis (468) o la existencia de un factor protector en los tubos seminíferos o en la pared tubular podría explicar la distribución peritubular de las células de Leydig observada en algunas pacientes de la presente serie. Además, el efecto dual en sentido opuesto de los estrógenos sobre el número de células de Leydig provoca la distribución irregular observada en el 64% de las pacientes de este estudio. La distribución septal podría deberse a la existencia de algún factor protector presente en el torrente sanguíneo o secretado por el tejido vascular. En algunas pacientes se



observaron células de Leydig, macrófagos y/o mastocitos en la luz de los tubos seminíferos. Este hallazgo probablemente se deba a que la desdiferenciación de la pared tubular provoca el depósito de componentes de la matriz extracelular (con la técnica de orceína se observó un aumento de fibras elásticas) de manera semejante al hallazgo ya descrito por De la Balze en pacientes con cáncer de próstata tratados con estrógenos (29). Durante el proceso de hialinización tubular las células localizadas alrededor de los tubos seminíferos podrían quedar atrapadas en la pared o en la luz de los tubos seminíferos (425).

El efecto de los estrógenos exógenos sobre la **vía espermática**, incluyendo la **rete testis y el epidídimo**, las **células inflamatorias**, las **estructuras vasculares**, la **albugínea** y la **túnica vaginal** ha sido mucho menos estudiado, encontrándose muy escasas descripciones en la literatura. Por ello, en el presente trabajo se han estudiado en profundidad los cambios celulares en la rete testis y epidídimo, la presencia de células inflamatorias y la morfología de las estructuras vasculares, la albugínea y la túnica vaginal en respuesta a la terapia hormonal a largo plazo con estrógenos y antiandrógenos. Al igual que en la serie de Sapino et al (457), en el presente estudio se ha encontrado metaplasia columnar del epitelio de la rete testis hasta en el 76% de las pacientes. Este hallazgo podría estar en relación con el colapso de la rete testis provocado por la atrofia de los tubos seminíferos del mediastino testicular (429). En el ser humano, Sapino et al (457) también describieron hipertrofia e hiperplasia adenomatosa en el epitelio de la rete testis. En nuestro estudio hemos encontrado tanto hiperplasia como atrofia del epitelio de la rete testis y dilatación de la rete testis. En los años 80 Newbold

et al (441) observaron que la exposición prenatal al dietilestilbestrol provocaba hiperplasia epitelial de la rete testis en ratones.

A nivel del **epidídimo**, en este estudio se ha encontrado que el diámetro medio de los conductillos eferentes y del conducto epididimario disminuyó a medida que aumentó el PHP. La lesión más frecuentemente identificada fue atrofia del conducto principal del epidídimo. En animales está descrita la atrofia durante el período prenatal (442) y la exfoliación de los estereocilios en la juventud (438) tras la exposición a ftalatos. Además, también en modelos experimentales en animales, se ha observado la modificación de la expresión de genes esenciales para el desarrollo y el funcionamiento del epidídimo tras la exposición a disruptores endocrinos ambientales con efecto estrogénico (469). Hess RA et al (470) también observaron la disminución de la altura del epitelio de los conductillos eferentes en ratones “knock-out” para el receptor de estrógenos. En el ser humano, Sapino et al (457) describen hipertrofia e hiperplasia epitelial de los conductillos eferentes y de las células principales del conducto principal del epidídimo y células basales prominentes en mujeres transgénero adultas en tratamiento con estrógenos. En nuestro estudio en la mitad de las pacientes las células principales del epidídimo mostraron vacuolización y se observó tanto hiperplasia como atrofia de las células basales en 5 y 35 pacientes, respectivamente. Pero a diferencia de lo encontrado por Sapino et al (457) no se ha observado ni hipertrofia ni hiperplasia del epitelio de los conductillos eferentes.

Además de la atrofia del epitelio del epidídimo, en este trabajo se ha identificado pérdida del contorneado interno de los conductillos eferentes, pérdida del patrón cribiforme en el conducto principal del epidídimo, pérdida

de estereocilios en las células principales e hiperplasia de células basales. El diámetro medio de los conductillos eferentes disminuyó en paralelo al aumento del PHP, mientras que la pérdida del patrón cribiforme y/o de estereocilios en las células principales y la hiperplasia de células basales aumentó en paralelo a la mayor desdiferenciación de las células de Sertoli. La atrofia de células basales y la disminución del patrón cribiforme en el conducto principal del epidídimo observada indican que los estrógenos no sólo provocan atrofia, sino que también dificultan la regeneración epitelial (471,472).

Algunas pacientes con PHPs I o II mostraron ectasia tubular o dilatación de la rete testis y también se observó dilatación de los conductillos eferentes o del conducto principal del epidídimo. Los estrógenos regulan la reabsorción del fluido luminal en las células de Sertoli (76) y en el epitelio de los conductillos eferentes (89). Por ello, la alteración de este proceso por un exceso de estrógenos podría explicar los hallazgos observados. La alteración de la expresión del receptor de andrógenos por los estrógenos también podría participar en la alteración de este proceso, ya que en ratones “knock-out” para el receptor de andrógenos en las células de la pared tubular se ha identificado una reducción de la producción de fluido por las células de Sertoli (473). La exposición a ftalatos durante la adolescencia provoca la dilatación del epidídimo en animales (438). Además, la atrofia de las células basales del conducto principal del epidídimo posiblemente contribuya a la malabsorción, ya que en condiciones normales estas células actúan como sensores del fluido luminal y participan en la regulación del pH (474).

Otro de los objetivos del presente trabajo fue el estudio de las **células inflamatorias** en los testículos de pacientes transgénero tratadas prolongadamente con estrógenos. En esta serie se han observado infiltrados linfocitarios en los tubos seminíferos, en el intersticio del parénquima testicular (frecuentemente perivenulares), en los conductillos eferentes (en una paciente estaban entremezclados con eosinófilos) y en el conducto principal del epidídimo. También se han identificado macrófagos intratubulares, en la luz de los conductillos eferentes (PHP III) y del conducto principal del epidídimo (PHP II) y abundantes macrófagos en el intersticio del parénquima testicular y en el epidídimo (en una paciente se observó una reacción xantogranulomatosa en relación con conductillos eferentes necróticos). En el 78% de las pacientes asimismo hubo menos de 10 células de Leydig por macrófago. También se observó infiltrado inflamatorio de predominio neutrofílico en los tubos seminíferos y mastocitosis en el epidídimo, aunque todas las pacientes mostraron un número reducido de mastocitos intersticiales a nivel del parénquima testicular. Además, la alteración de la relación células de Leydig/ macrófagos y el número medio de macrófagos peritubulares aumentó en paralelo al PHP. Sin embargo, el número medio de mastocitos disminuyó en paralelo al aumento PHP.

En el testículo adulto en condiciones normales no se observan macrófagos intratubulares (475). Los estrógenos promueven la supervivencia de los macrófagos en el ser humano (57) y en modelos experimentales en animales se ha observado que estimulan su proliferación (186). Schulze (30) también identificó numerosos macrófagos intersticiales y peritubulares en el parénquima testicular procedente de piezas de orquiectomía de mujeres

transgénero que habían recibido previamente tratamiento con estrógenos a largo plazo. Además, en el parénquima testicular adulto en condiciones normales hay aproximadamente 1 macrófago residente por cada 10-50 células de Leydig (461) a nivel intersticial, pero en un modelo experimental en ratones Yu et al (75) describieron que la administración de estrógenos promueve la apoptosis en las células de Leydig y su fagocitosis por macrófagos activados, lo que explicaría la alteración de la relación células de Leydig/macrófagos a nivel del intersticio del parénquima testicular observada en el presente estudio.

En el testículo en condiciones normales, en ausencia de una infección o una inflamación concomitante, no se observan linfocitos (476). Sin embargo, en ratones está descrito el aumento del número de linfocitos, macrófagos y la infiltración por neutrófilos a nivel de la luz del epidídimo tras la administración de estrógenos durante el período neonatal (185). Respecto a la epididimitis isquémica granulomatosa observada en una paciente en la presente serie, este hallazgo podría deberse a que los macrófagos no reconozcan los antígenos de las células germinales liberadas al intersticio tras la necrosis del epitelio de los conductillos eferentes (477). En modelos animales se ha observado que los estrógenos ejercen un efecto dual en direcciones opuestas sobre la proliferación de los mastocitos. Está descrito tanto el incremento del número de mastocitos (186,187,478) como su disminución tras el aumento inicial (188) en respuesta a los estrógenos y se piensa que la alteración de su número, ya sea por exceso (479,480) o por defecto (481), podrían promover la hialinización de la pared tubular. En el intersticio del parénquima testicular procedente de biopsias testiculares de pacientes con cáncer de próstata

tratados con estrógenos (29) también identificaron un aumento del número de mastocitos. Además, estos mismos autores describieron un aumento en el número de células plasmáticas, hallazgo no observado en el presente estudio. En el epidídimo se ha observado una alteración de la proliferación/diferenciación de las células basales y estas células liberan prostaglandinas (89), por lo que seguramente su atrofia e hiperplasia contribuya a la desregulación de la inmunidad en el epidídimo. El efecto antiandrógeno de los estrógenos igualmente promueve la inflamación (205). La terapia hormonal podría alterar la respuesta inmune en múltiples órganos y está descrito el desarrollo de enfermedades inmunológicas sistémicas en relación con la administración de la terapia hormonal cruzada en mujeres transgénero (212-214).

Uno de los hallazgos más interesantes del presente estudio, previamente no descritos, y posiblemente con mayor posibilidad de repercusión sistémica se encontraron en el estudio de las **estructuras vasculares**. Los estrógenos también participan en la etiopatogenia de enfermedades venosas (223,268, 269,274,410) y del sistema linfático (222). En el presente estudio se observaron dilataciones venosas, hialinización de la pared de las venas y linfangiectasias. Además, el 71% de las pacientes mostraron una reducción asimétrica de la luz de pequeñas arteriolas por el depósito subendotelial de una sustancia amorfa y eosinófila con la técnica de H-E. La hialinosis arteriolar es un hallazgo presente en la mayoría de los testículos adultos (482) y asimismo descrita en mujeres transgénero que han recibido tratamiento con estrógenos a largo plazo (30). Se identificó hialinosis arteriolar severa en algunas pacientes con PHPs II o III.

Al aumentar el tamaño muestral en el presente estudio se han observado patologías graves no mencionadas previamente en la literatura en mujeres transgénero en relación con la terapia hormonal cruzada, tales como vasculitis y aterosclerosis, en pacientes jóvenes. En la pared de una arteria intratesticular de mediano calibre, subalbugínea, que mostraba severa fibrosis intimal, se observó un denso infiltrado inflamatorio segmentario compuesto principalmente por linfocitos. Además, otra paciente mostró un denso infiltrado linfocitario transmural sobre un fondo de necrosis extensa en una arteria de pequeño calibre del epidídimo.

La vasculitis testicular, aunque puede presentarse de forma aislada (483), frecuentemente forma parte de una enfermedad sistémica (484) y descartarlo es esencial, ya que determina el tratamiento y el pronóstico. Dentro de las vasculitis sistémicas, la más frecuente a nivel testicular es la poliarteritis nodosa (485). Esta enfermedad afecta a arterias de pequeño y mediano calibre, como las de las dos pacientes del presente estudio, pero también generalmente se observa un fondo extenso de necrosis con afectación segmentaria (484). No obstante, la necrosis podría estar ausente en el inicio de la enfermedad. Histológicamente las formas aislada y sistémica son indistinguibles, pero en este estudio la vasculitis fue un hallazgo aislado en las dos pacientes y ambas estaban asintomáticas. En una tercera paciente se observó una epididimitis isquémica. Esta lesión asimismo podría estar en relación con una vasculitis previa o lesiones ateroscleróticas y la presencia de epididimitis isquémica se considera un factor de mal pronóstico (486). Este hallazgo es preocupante dado que en las piezas quirúrgicas testiculares estudiadas por otros motivos sólo se observa vasculitis en el 0,003% de las

pacientes (485) mientras que en el presente estudio se ha observado en el 5% de estas pacientes tratadas con estrógenos.

La mitad de las pacientes, 43% de los cuales tenían menos de 30 años, asimismo mostraron lesiones ateroscleróticas que obstruían más del 50% de la luz en múltiples arterias, mayoritariamente localizadas por debajo de la albugínea. Aunque inicialmente se consideró que estos cambios podrían estar en relación con una involución vascular secundaria a la atrofia testicular, esa hipótesis es improbable porque las paredes arteriales muestran un engrosamiento de la íntima y la túnica media y los hallazgos histológicos son análogos a los observados en la aterosclerosis en pacientes de edades más avanzadas. Además, en una paciente la aterosclerosis se acompañó de un infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos.

La frecuencia y severidad de las lesiones ateroscleróticas a una edad tan temprana, a pesar de que sólo el 24% de las pacientes presentaban factores de riesgo cardiovasculares, es llamativa y preocupante. La terapia hormonal cruzada es un tratamiento sistémico, por lo que las lesiones ateroscleróticas y la vasculitis podría estar presente en otros órganos y provocar graves consecuencias, como ICTUS e infartos de miocardio (27). Los hallazgos encontrados llevan a preguntarse qué factores promueven un efecto pro-aterogénico de los estrógenos en el ser humano. Desde hace décadas se sabe que los estrógenos pueden proteger frente al desarrollo de las enfermedades cardiovasculares (258), pero asimismo se ha identificado que estas hormonas pueden participar en el desarrollo de aterosclerosis (221,260). En el presente estudio no se ha observado relación entre la severidad de las lesiones de aterosclerosis y la edad de la paciente, ni con la



edad al inicio de la terapia hormonal. En la literatura está descrita la presencia de niveles plasmáticos elevados de estrógenos en hombres con enfermedad arterial coronaria (261), por lo que la alteración de los niveles hormonales fisiológicos por la terapia hormonal cruzada y la automedicación probablemente participe en el desarrollo de aterosclerosis. La duración del tratamiento también podría tener un papel importante, porque Mori et al (487) no observaron efectos vasoprotectores tras la administración de estrógenos a largo plazo en un modelo experimental animal. Además, el efecto antiandrogénico de los estrógenos (259) asimismo empeora el perfil lipídico (488) y altera la secreción de algunas moléculas (489), tales como el inhibidor del activador del plasminógeno-1, que participa en la regulación de la fibrinólisis y de la enfermedad cardiovascular (490).

El mesotelio de la **túnica vaginal** mostró metaplasia urotelial en el 36% de las pacientes y metaplasia cúbica en el 21%. No hay descripciones previas de este hallazgo en mujeres transgénero tratadas con estrógenos. Sin embargo, a nivel de la próstata está descrita la inducción de cambios metaplásicos (353, 354) y la hiperplasia de células con fenotipo basal tras la administración de estrógenos a animales (354).

El espesor de la **túnica albugínea** estuvo dentro de los límites de normalidad para el adulto en la mayoría de las pacientes, pero el 31% de las pacientes mostraron una disminución del espesor y en una paciente su espesor estuvo aumentado. No hay datos de las alteraciones de la albugínea en pacientes transgénero tratadas con estrógenos, pero sí De la Balze et al (29) observaron un engrosamiento de la albugínea en biopsias testiculares procedentes de pacientes con cáncer de próstata que habían recibido

tratamiento con estrógenos.

Además de lo previamente descrito en el presente estudio se encontraron **otros hallazgos morfológicos** semejantes en varios tipos celulares. En la presente serie, las células de Sertoli, las células de Leydig, el epitelio de los conductillos eferentes, las células principales y basales del conducto epididimario y, de forma aislada, las espermatogonias, el epitelio de la rete testis y el mesotelio de la túnica vaginal mostraron vacuolización citoplasmática. Este hallazgo morfológico podría deberse a alteraciones del metabolismo de los lípidos y de los glúcidos (237), por unos niveles inadecuados de estrógenos. De la Balze et al (29) observaron un aumento de lípidos y glúcidos en el citoplasma de las células de Sertoli en pacientes con cáncer de próstata tratados con estrógenos. En otros estudios, las mujeres transgénero que han recibido terapia hormonal también muestran acumulación de gotas lipídicas y vacuolas ricas en glucógeno en el citoplasma de las células de Sertoli (30) y un aumento del depósito de lípidos en las células de Leydig (456) y en el tejido conectivo intersticial (32). De la Balze et al (29) señalaron que el depósito de lípidos podría estar provocado por una disminución de su uso debido al descenso del número de células germinales y Schulze (30) indicó que las inclusiones lipídicas podrían deberse a la fagocitosis de células germinales degeneradas. Las células de Sertoli y de Leydig inmaduras también muestran un aumento del depósito de glucógeno (413) e inclusiones lipídicas (491). La vacuolización citoplasmática asimismo puede observarse en células atróficas (492) o apoptóticas (493) y está descrita tras la administración de estrógenos a animales en las células de Sertoli en relación con la fagocitosis de células germinales (404). No obstante,

la vacuolización citoplasmática del epitelio de los conductillos eferentes está descrita en jóvenes sin patologías aparentes del aparato reproductor (89).

Otros hallazgos morfológicos identificados en el presente estudio fueron cambios granulares eosinófilos en células de Sertoli desdiferenciadas (PHPs II o III), aumento del depósito de lipofucsina en el citoplasma de las células de Leydig y del epitelio de los conductillos eferentes y células de Leydig multinucleadas. Payer et al (456) han descrito previamente la presencia de células de Leydig con aumento del depósito de lipofucsina en mujeres transgénero que habían recibido terapia hormonal. La desregulación del metabolismo oxidativo por unos niveles inadecuados de estrógenos (93) probablemente provoque un aumento del número de lisosomas y, como resultado, un aumento del depósito de lipofucsina (456) y el cambio granular eosinófilo (494). La atrofia de células basales en el epidídimo por los estrógenos también puede contribuir a la desregulación del metabolismo oxidativo (89). Además, el número de células de Leydig multinucleadas aumenta con el envejecimiento (495) y en esta etapa el estrés oxidativo también se incrementa.

En la presente serie, algunas pacientes también mostraron depósito de calcio en el parénquima testicular, en la túnica vaginal y en el conducto principal del epidídimo. Las microcalcificaciones están descritas en relación con la exposición a disruptores estrogénicos ambientales en animales vertebrados (496), pero también pueden observarse microlitiasis en aproximadamente el 2% de la población general asintomática (497). La calcificación de la túnica vaginal es muy rara y puede observarse en asociación con hidrocele (498), que puede desarrollarse en relación con la

exposición a ftalatos durante el primer trimestre (499), pero no se observó hidrocele durante el tallado en la paciente que mostró la calcificación en la túnica vaginal.

En este trabajo se ha realizado un detallado **estudio inmunohistoquímico** para determinar el inmunofenotipo de los diferentes componentes celulares del parénquima testicular y de las vías espermáticas dado que son muy escasos los estudios inmunohistoquímicos previos en pacientes sometidas a tratamientos prolongados con estrógenos y antiandrógenos. La desdiferenciación celular de las células de Sertoli fue confirmada por la expresión de cuerpos de **inhibina**, e inmunotinción positiva para **calretinina**, **D2-40** y **CK8/18/19** en el citoplasma de estas células de Sertoli, todos ellos datos que indican inmadurez de las células de Sertoli en un individuo adulto. En el presente estudio, se observó una tinción citoplasmática difusa con inhibina en las células de Sertoli en todos los testículos, como corresponde en el adulto (500). La inhibina B es el principal regulador negativo gonadal de la secreción de FSH en hombres sanos (105). Las células de Sertoli comienzan a expresar inhibina en la etapa fetal (422) y su expresión se mantiene en el testículo adulto (500). Pero durante los períodos fetal, neonatal e infantil las células de Sertoli expresan cuerpos de inhibina, debido al tránsito lento de la inhibina a través del retículo endoplásmico (422). Además, el 69% de las pacientes expresaron cuerpos de inhibina en células de Sertoli morfológicamente desdiferenciadas. Ninguna paciente con PHP I expresó cuerpos de inhibina en las células de Sertoli. Pero a medida que aumentó la desdiferenciación morfológica en las células de Sertoli se observó su reexpresión y todas las pacientes con PHP III reexpresaron cuerpos de

inhibina en células de Sertoli morfológicamente desdiferenciadas. En nuestro estudio el 57% de las pacientes, con PHPs II o III, expresaron calretinina en células de Sertoli morfológicamente desdiferenciadas. La calretinina es una proteína ligadora de calcio (501) y este ion está implicado en muchos procesos biológicos, entre los que se encuentra la diferenciación celular (502). Las células de Sertoli fetales expresan calretinina (503). El ion calcio participa en la esteroidogénesis en animales (504) y hay autores que sostienen que la expresión de calretinina podría indicar la síntesis de hormonas esteroideas (503). Las células de Sertoli adultas no expresan calretinina en condiciones normales (421). Las células de Sertoli asimismo dejan de expresar CK18 en la semana 20 fetal (505) y D2-40 en la etapa puberal (506). La CK18 también puede expresarse en el adulto en el epitelio seminífero atrófico (418). También se observó expresión de D2-40 en células de Sertoli morfológicamente desdiferenciadas en todas las pacientes excepto en una con PHP III y en el 42% de las pacientes con PHP II. Tres pacientes con PHPs II y III asimismo expresaron CK8/18/19 en células de Sertoli muy desdiferenciadas. La desdiferenciación celular observada por Nistal et al (31) fue menor y ninguna paciente reexpresó CK18 en las células de Sertoli. Además, algunas pacientes expresaron calretinina y/o CK8/18/19 en el epitelio seminífero atrófico de tubos seminíferos ectásicos (PHP I o II). En la serie de Nistal et al (31) también se observó la expresión de cuerpos de inhibina, calretinina y D2-40. Las células de Leydig expresan inhibina y calretinina desde la etapa fetal (422,503) y su expresión se mantiene en el testículo adulto (500,507). En este estudio todas las células de Leydig observadas mostraron una tinción citoplasmática difusa con inhibina y citoplasmática y nuclear difusa con

calretinina.

Además, se encontró pérdida de expresión del **receptor de andrógenos** en las células de Sertoli, en la pared tubular y en el conducto principal del epidídimo y de **actina de músculo liso** en la pared tubular y en la túnica albugínea. Las células de Sertoli comienzan a expresar el receptor de andrógenos en la etapa neonatal tardía. Hasta los 3-4 años de edad la expresión del receptor de andrógenos en las células de Sertoli es muy focal (508) y su expresión va aumentando progresivamente hasta ser difusa a partir de los 8 años de edad y alcanzar su máxima expresión en el adulto (508,509). En este estudio la expresión del receptor de andrógenos estuvo conservada en todas las pacientes con PHP I en las células de Sertoli, pero en el 30% de pacientes (PHPs II o III) se observó una pérdida de expresión. La pérdida de expresión del receptor de andrógenos en las células de Sertoli a su vez fue mayor en las pacientes con PHP III. En nuestra serie se identificaron espermátidas redondas en un tubo seminífero con células de Sertoli que no expresaban el receptor de andrógenos en una paciente. No obstante, la expresión del receptor de andrógenos se conservó en todas las pacientes que mostraron espermatogénesis completa de forma difusa.

Los cambios encontrados en el receptor de andrógenos en esta serie pueden explicar las alteraciones encontradas en la espermatogénesis. La expresión del receptor de andrógenos también es fundamental para la correcta comunicación paracrina entre las células testiculares porque, aunque las células germinales no lo expresan (510), los andrógenos regulan la espermatogénesis indirectamente a través de su acción sobre las células de Sertoli (511) y la pared tubular (508,512,513). Las células germinales a su vez

también pueden modificar la expresión del receptor de andrógenos en las células de Sertoli (514) y ,aunque hay autores que defienden que la expresión del receptor de andrógenos en las células de Sertoli no es necesario para la progresión meiótica de las células germinales y diferenciación hasta espermatidas tempranas (515), en ratones “knock-out” para el receptor de andrógenos en las células de Sertoli se identificó que el número de espermátocitos y espermatidas redondas se reducía al 64% y al 3%, respectivamente (511). La disminución de la expresión del receptor de andrógenos en las células de Sertoli provoca un aumento de la apoptosis en las células germinales (511) y la desregulación del proceso de apoptosis por los estrógenos asimismo puede alterar el tamaño de las células germinales (56). Además, pueden observarse espermatogonias hipertróficas y multinucleadas en condiciones normales en los testículos infantiles (516).

La espermatogénesis también está alterada en ratones “knock-out” para el receptor de andrógenos en las células de la pared tubular. Las células de Sertoli y de la pared tubular en condiciones normales se comunican y se ha observado que la alteración del receptor de andrógenos en la pared tubular provoca una reducción del diámetro tubular, la desorganización de las células de Sertoli en los tubos seminíferos y la disminución de la expresión de genes dependientes de andrógenos en las células de Sertoli (473). Además, los andrógenos asimismo aumentan la expresión del receptor de andrógenos y de marcadores mioides en la pared tubular (489).

La disminución de las células de Leydig también contribuye al fallo de la espermatogénesis. Existe una regulación paracrina entre las células de Leydig y las células germinales, porque la estructura de las células de Leydig varía

según los estadios de la espermatogénesis (468) y en ratones knockout para el receptor de andrógenos en las células de Leydig se ha observado una alteración de la esteroidogénesis y la detención de la espermatogénesis en espermátidas redondas (517). Por otro lado, la secreción de testosterona y de INSL3 por las células de Leydig asimismo es necesaria para la supervivencia de las células germinales (464,518).

Las células mioides peritubulares expresan el receptor de andrógenos desde la etapa fetal hasta la edad adulta (509). En el epidídimo adulto la expresión del receptor de andrógenos a nivel del epitelio de los conductillos eferentes es variable (89,519) y este receptor también se expresa en el epitelio del conducto principal del epidídimo (520) y de forma variable en la pared muscular del epidídimo (520,521). En el presente trabajo la expresión del receptor de andrógenos en la pared tubular estuvo ausente en el 8% de las pacientes (PHP III). La expresión del receptor de andrógenos fue variable en el epitelio de los conductillos eferentes, como corresponde en el testículo adulto (89,519). La expresión del receptor de andrógenos en las células principales estuvo disminuida en el 18% de las pacientes (PHPs II y III) y el 39% de las pacientes no expresaron el receptor de andrógenos en la pared muscular del epidídimo.

En modelos experimentales en animales (106,522) y en el ser humano (60) se ha identificado que los estrógenos pueden modificar la expresión del receptor de andrógenos, estrógenos y progesterona en el testículo. La administración crónica de estrógenos a ratas disminuye la expresión proteica del receptor de andrógenos en el testículo adulto (106), pero también está descrito el aumento de la expresión del receptor de andrógenos en la trompa



uterina del ratón por los estrógenos (522). La administración crónica de estrógenos a ratas adultas asimismo aumenta la expresión del receptor de estrógenos en el testículo (106) y la administración de estrógenos puede aumentar la expresión del receptor de progesterona (60). La mayoría de las células progenitoras de las células de Leydig adultas expresan el receptor de andrógenos (523), pero tanto las células de Leydig adultas como las células estromales CD34+ expresan el receptor de andrógenos de forma parcheada (420,524).

Por otro lado, el epitelio del conducto principal del epidídimo no expresa el **receptor de estrógenos** en el adulto (519). En la presente serie, el 24% y el 40% de las pacientes expresaron el receptor de andrógenos de forma difusa en las células estromales CD34+ y en las células de Leydig, respectivamente (PHPs II o III). La expresión del receptor de andrógenos en el epitelio de la rete testis fue variable. La expresión del receptor de estrógenos en la rete testis fue parcheada en el 43% de las pacientes (PHPs II y III) y ausente o focal en el resto de las pacientes. El epitelio del conducto principal del epidídimo expresó el receptor de estrógenos de forma focal en el 78% de las pacientes. Todas las pacientes expresaron el receptor de estrógenos y de progesterona en el epitelio de los conductillos eferentes, como corresponde en el testículo adulto (89,519).

En el testículo adulto la pared tubular está constituida por 3-5 capas alternas: las capas más internas son miofibroblastos que expresan actina y las capas más externas son fibroblastos **CD34+**. A nivel de la albugínea asimismo hay miofibroblastos que expresan actina (525). El 84% de las pacientes mostraron una pérdida de expresión de actina de músculo liso en la

pared tubular y en el 74% se observó la sustitución de los miofibroblastos por fibroblastos CD34+. Con la técnica de **colágeno IV** también se observó que el engrosamiento de la pared tubular era mayoritariamente a expensas de un aumento del depósito de colágeno IV. Estos hallazgos coinciden con los encontrados en la serie de Nistal et al (31) en relación a la pérdida de expresión del receptor de andrógenos en células de Sertoli morfológicamente desdiferenciadas y la pérdida de expresión de actina en la pared tubular en respuesta a la terapia hormonal cruzada en mujeres transgénero. Sin embargo, sólo el 11% de las pacientes mostraron una pérdida de la expresión de actina de músculo liso a nivel de la albugínea (PHPs II y III).

Los estudios publicados en la literatura arrojan resultados contradictorios en relación con la expresión del receptor de progesterona en las células de Sertoli adultas en el ser humano (519,526), pero se expresa focalmente en la pared tubular, en las células estromales CD34+, en las células de Leydig y en las células musculares de la pared del epidídimo en el adulto (60,519,526). Sin embargo, el receptor de progesterona no se expresa en el epitelio de la rete testis ni en el epitelio del conducto principal del epidídimo en el testículo adulto (519).

En el presente estudio el **receptor de progesterona** se expresó en las células de Sertoli desdiferenciadas (PHPs II y III) y en una paciente en células de Sertoli atróficas en un tubo seminífero ectásico. El receptor de progesterona se expresó de forma parcheada en la pared tubular y en las células de Leydig en algunas pacientes con PHPs II y III. Algunas pacientes expresaron el receptor de progesterona de forma parcheada o difusa en las células estromales CD34+, de forma parcheada en la pared muscular del

epidídimo, de forma focal o parcheada en el epitelio de la rete testis y focalmente en el epitelio del conducto principal del epidídimo. La sobreexpresión del receptor de progesterona puede tener implicaciones funcionales. En modelos animales se ha observado un aumento de la expresión del receptor de progesterona cuando falla la espermatogénesis por privación hormonal (527) y Luetjens et al (60) han señalado que la progesterona inhibe la contracción muscular y enlentece el tránsito del fluido luminal a través de los tubos seminíferos y el conducto principal del epidídimo.

Los estudios inmunohistoquímicos para **triptasa** y **CD68** se utilizaron para una mejor identificación de los mastocitos y macrófagos respectivamente que facilitara su recuento celular.

El último de los objetivos del presente estudio era comparar los hallazgos encontrado en esta amplia serie de pacientes con tratamientos prolongados con estrógenos y antiandrógenos con los descritos en la literatura en pacientes con **síndrome de disgenesia testicular**. Bajo el nombre de síndrome de disgenesia testicular, propuesto por Skakkebaek et al (371), se incluyen varias entidades tales como criptorquidia, infertilidad, hipospadias y tumores testiculares de células germinales, todas ellas relacionadas con un déficit androgénico, probablemente ocasionado por un desbalance andrógenos/estrógenos como consecuencia del efecto de disruptores endocrinos. Nistal et al (31) han señalado previamente la semejanza existente entre las lesiones celulares en respuesta a la terapia hormonal cruzada y las observadas en el síndrome de disgenesia testicular en una serie de pacientes más pequeña. Este trabajo corrobora en una serie más amplia que las lesiones observadas en el presente estudio son equiparables a las descritas

en el síndrome de disgenesia testicular. En el síndrome de disgenesia testicular se identifican tubos seminíferos hipoplásicos aislados o agregados constituyendo zonas hipoplásicas o nódulos de Sertoli (413-417) y las células de Sertoli inmaduras expresan cuerpos de inhibina (422), CK8/18/19 (419,528) y calretinina (421) y disminuye la expresión del receptor de andrógenos (420), hallazgos todos ellos encontrados en la presente serie. También puede observarse un engrosamiento de la membrana basal (413,414,416,424) o tubos seminíferos hialinizados (415) y una disminución de la expresión de marcadores de músculo liso (529).

La presencia de células de Leydig poligonales en la túnica propia es un hallazgo frecuentemente identificado en el síndrome de disgenesia testicular, pero en el testículo normal sólo se observan células de Leydig en esta localización ocasionalmente y con una morfología fusiforme (530). Las células de Leydig intratubulares asimismo no se observan en condiciones normales, pero están descritas en el síndrome de disgenesia testicular (425). Además, pueden identificarse células de Leydig inmaduras o hiperplásicas (413, 414,416,426-428) e hiperplasia adenomatosa de la rete testis (415,429) y/o atrofia del epidídimo (430). Muchos de estos hallazgos morfológicos descritos en el síndrome de disgenesia testicular son superponibles a los encontrados en esta serie, con la diferencia de que en el síndrome de disgenesia testicular falla la maduración (386), mientras que la terapia hormonal cruzada provoca una desdiferenciación celular.

En el síndrome de disgenesia testicular pueden observarse vacuolas en el citoplasma de las células de Sertoli (531). Además, está descrito un aumento del depósito de lipofuscinas en el epidídimo en la azoospermia obstructiva

(430) y cambio granular eosinófilo en las células de Sertoli en testículos criptorquídicos (494) y en biopsias testiculares procedentes de pacientes infértiles (413). En el síndrome de disgenesia testicular asimismo pueden observarse tubos seminíferos dilatados (413,415) y microcalcificaciones (415,416,426,532-534). También pueden observarse linfocitos intersticiales y peritubulares infiltrando tubos seminíferos (413,476,535) y macrófagos intratubulares, éstos últimos probablemente en relación con la fagocitosis y destrucción de células germinales (535,536), y está descrita la elevación del recuento de la serie blanca en sangre en pacientes con cáncer testicular (537). Naito et al (185) relacionaron el aumento del número de linfocitos en el epidídimo y en el conducto deferente en respuesta a la administración neonatal de estrógenos a animales con el desarrollo de azoospermia obstructiva. Por otro lado, al igual que en el presente estudio, Mechlin et al (481) observaron un menor número de mastocitos en los testículos criptorquídicos que mostraron un mayor engrosamiento de la pared tubular. Sin embargo, otros autores han identificado una correlación positiva entre el número de mastocitos y el grado de hialinización de la pared tubular en pacientes infértiles (462,479,538). La presencia de linfocitos perivenulares está descrita en las biopsias testiculares de pacientes infértiles (413,476). Además, en biopsias procedentes de pacientes infértiles pueden identificarse venas dilatadas o con engrosamiento del espesor de su pared (413). La hialinosis arteriolar asimismo está descrita en el síndrome de disgenesia testicular (415, 482) y Fleischmann y Studer (539) observaron una arteritis en asociación con un tumor de células germinales testicular.

Asimismo, pueden observarse espermatogonias hipertróficas y

multinucleadas (415,423) y espermatoцитos descamados en la luz de los tubos seminíferos (415). A pesar de la existencia de numerosos estudios que señalan la implicación de los estrógenos en el desarrollo de cáncer testicular (125, 148,412), no se identificó neoplasia de células germinales intratubular en ninguna paciente en el presente estudio. No obstante, los síntomas más graves del síndrome de disgenesia testicular son asimismo los más infrecuentes (371) y la desdiferenciación celular provocada por la terapia hormonal cruzada podría estar implicada en la carcinogénesis porque está descrito el desarrollo de cáncer testicular en relación con la terapia hormonal feminizante (148) y el patrón de sólo células de Sertoli en los tubos seminíferos se asocia con un mayor riesgo de padecer cáncer testicular (540). Sin embargo, la diferencia en la incidencia de neoplasia de células germinales in situ descrita en el síndrome de disgenesia testicular y la encontrada en la presente serie podría estar en el momento en que actúan los estrógenos sobre las células germinales; en la vida intrauterina en el síndrome de disgenesia testicular provocando un defecto en la maduración de los gonocitos por probable defecto de las células de Sertoli y en la vida adulta en la presente serie en la que se observa un desdiferenciación de las células de Sertoli que no habría condicionado un efecto en la maduración de los gonocitos.

Finalmente, en el presente estudio se ha intentado establecer una **relación entre los patrones histológicos y la terapia hormonal** y se ha observado que varios factores influyen en la respuesta histopatológica. Todas las pacientes con PHP III recibieron tratamiento durante menos de 8 años. Además, se observó un efecto dosis-dependiente, excepto en dos pacientes que recibieron una duración de tratamiento muy diferente (3 y 30 años). La

paciente de mayor edad al inicio del tratamiento asimismo mostró un PHP III en la pieza de orquiectomía bilateral. Por otro lado, las pacientes tratadas con estrógenos transdérmicos no mostraron una menor respuesta celular, en concordancia con lo señalado por otros autores (231,280), y la única paciente que recibió tratamiento exclusivamente con estrógenos mostró un PHP II y niveles disminuidos de testosterona, lo cual podría indicar que los fármacos antiandrogénicos aportan relativamente poco al efecto antiandrogénico de los estrógenos, como han afirmado previamente Levy et al (259).

Chighizola et al (23) han indicado que la exposición aguda a los estrógenos es más perjudicial que la exposición crónica, probablemente porque las células tardan un tiempo en adaptarse a los cambios hormonales, y Leavy et al (32) señalaron que la administración de la terapia hormonal cruzada a largo plazo puede provocar una reducción de la respuesta del receptor al tratamiento o un aumento de la eliminación de los fármacos, lo que podría explicar los hallazgos observados en el presente estudio. No obstante, Schulze (30) y Nistal et al (31) describieron una mayor respuesta histopatológica en los testículos procedentes de mujeres transgénero que habían recibido tratamiento hormonal durante más de 10 años y Sapino et al (457) no observaron relación entre la duración del tratamiento y la respuesta histopatológica. De la Balze et al (29) y Nistal et al (31) también identificaron una respuesta histopatológica dosis-dependiente a los estrógenos en pacientes con cáncer de próstata y mujeres transgénero, respectivamente. La menor alteración de la espermatogénesis en los estudios más recientes asimismo podría deberse al empleo de menores dosis de fármacos en la actualidad. Schulze (30) y Sapino et al (457) identificaron parada de la

maduración en espermatogonias en todas las pacientes y Payer et al (456) observaron parada de la maduración en espermatoцитos sólo en 2 pacientes. Sin embargo, más recientemente Nistal et al (31) y Leavy et al (32) describieron una alteración de la espermatogénesis más heterogénea y observaron espermatogénesis completa en algunas piezas de orquitectomía procedentes de mujeres transgénero tras la terapia hormonal, más en concordancia con los hallazgos del presente estudio. Por otro lado, la mayor vulnerabilidad a los estrógenos en las edades extremas de la vida también ha sido señalada previamente por Schulze (30), Chighizola et al (23) y Sikka y Wang (19), probablemente en relación con la menor capacidad de adaptación a los cambios hormonales. Por lo tanto, la respuesta celular a la terapia hormonal cruzada se ve afectada por la duración de la terapia hormonal, la edad de inicio del tratamiento y la dosis administrada.

En el 77% de las pacientes los valores de estradiol estuvieron dentro de los límites de normalidad para la mujer, pero los valores de estradiol estuvieron aumentados en el 42% de las pacientes si tomamos como referencia los valores de normalidad para el varón. La terapia hormonal provocó mayoritariamente una disminución de los niveles de FSH, LH, pero en algunas pacientes con PHPs II o III los niveles de FSH y LH fueron normales a pesar de la disminución de los niveles de testosterona. En todas las pacientes excepto en una, cuya analítica fue realizada 67 meses antes de la cirugía, los niveles de testosterona estuvieron por debajo del límite de normalidad para el varón. En el presente estudio no se ha identificado ninguna relación entre los niveles hormonales y la respuesta histopatológica, aunque al tratarse de un estudio retrospectivo el análisis estuvo limitado por la fecha de la analítica más



cercana a la cirugía (el rango varió desde 1 mes hasta 78 meses antes de la cirugía).

Los estrógenos ejercen retroalimentación negativa sobre el testículo (2,202) y la hipófisis (61,103,104,105), aunque en modelos animales se ha observado que son necesarias mayores concentraciones hormonales para observar efectos en la hipófisis (112,404). La modificación de los niveles hormonales de testosterona, LH y FSH en respuesta a los estrógenos participa de forma indirecta en el fallo de la espermatogénesis porque los andrógenos regulan la secreción del factor neurotrófico derivado de la glía por las células de la pared tubular, esencial para la diferenciación de las células germinales (541), y en ausencia de testosterona, FSH y LH las células germinales sufren apoptosis (464,518). Además, las hormonas hipofisarias participan en la diferenciación celular (542) y su alteración asimismo podría haber contribuido a las alteraciones de la diferenciación/proliferación observadas en el presente estudio.

Wortsman et al (543) también observaron niveles de testosterona indetectables con niveles de LH y FSH inapropiadamente normales en un paciente tratado con estrógenos por cáncer de próstata y sugirieron que la terapia hormonal con estrógenos a largo plazo podría provocar una pérdida de la retroalimentación del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal. En mujeres transgénero, Rodríguez-Rigau et al (100) y Leavy et al (32) asimismo han descrito una disminución de los niveles de FSH, LH y testosterona en respuesta al tratamiento con estrógenos en series de casos con un menor tamaño muestral que el del presente estudio. Sapino et al (457) observaron una correlación entre el grado de atrofia testicular y la disminución de las

células de Leydig y de los niveles plasmáticos de gonadotropinas, hallazgos no identificados en el presente estudio, aunque cabe señalar que en dicho estudio las analíticas fueron realizadas en el momento de la cirugía.

El presente trabajo presenta algunas debilidades. Dado que las cirugías de reasignación de género son infrecuentes con el objetivo de tener un mayor tamaño muestral se incluyeron todas las piezas de orquiectomía bilateral realizadas entre los años 2009 y el 2019, por lo que el análisis de la respuesta histopatológica al tratamiento estuvo limitado por las diferentes características de las pacientes, tales como la edad en el momento de la cirugía, la presencia o ausencia de factores de riesgo o enfermedad cardiovascular y el origen de nacimiento (13 nacionalidades diferentes). Además, las pacientes iniciaron el tratamiento a diferente edad y la terapia hormonal administrada a las pacientes fue muy heterogénea (se emplearon diferentes tipos y dosis de tratamiento durante una duración variable). El análisis de la respuesta histopatológica a la terapia hormonal también estuvo dificultado por la automedicación y la adherencia terapéutica intermitente. Además, una paciente referenció haber recibido un tratamiento previo, sin especificar cuál, en su país de nacimiento y en otras 12 pacientes asimismo figuraba un origen diferente a España en la historia clínica, por lo que estas pacientes también podrían haber recibido otras terapias previamente. No se tomaron biopsias testiculares antes de iniciar la terapia hormonal cruzada para descartar la existencia de lesiones previas. No obstante, Schulze (30) describió desdiferenciación celular en una paciente transgénero que había tenido descendencia previamente a someterse al tratamiento hormonal. Tampoco se usó un grupo control, pero en series amplias de pacientes jóvenes con

infertilidad no se ha observado vasculitis, aterosclerosis, cambios inflamatorios o hiperplasia de células basales del epidídimo (459), ni está descrito en varones sanos (89).

La terapia hormonal cruzada es un tratamiento sistémico y sería excepcional que los efectos celulares observados estuviesen exclusivamente presentes en el testículo y el epidídimo. Por ello, es necesario reconsiderar la necesidad del uso de tratamientos combinados con fármacos antiandrogénicos y estrógenos y debe emplearse la menor dosis de fármacos posible en estas pacientes. Una forma de evaluar cuando se ha alcanzado el objetivo clínico puede ser la monitorización de los niveles de testosterona y del volumen testicular. Los hallazgos encontrados en el presente estudio señalan la necesidad de administrar la terapia hormonal cruzada en unidades especializadas, para poder sistematizar y estandarizar los tratamientos, sin olvidarse de las posibles particularidades individuales, y garantizar un adecuado control, vigilancia médica y seguimiento que detecte posibles efectos adversos. Además, la prevención de la automedicación y la discontinuidad del tratamiento sin supervisión médica es esencial en este grupo de pacientes. Previamente al inicio de la terapia hormonal los clínicos también deben informar sobre opciones para preservar la fertilidad y hacer saber a las pacientes que los estrógenos desempeñan numerosas funciones reguladoras y que la alteración de los niveles fisiológicos de estas hormonas puede estar implicada en el desarrollo de múltiples patologías.

Otros compuestos estrogénicos y anti-androgénicos podrían también estar implicados en el desarrollo del síndrome de disgenesia testicular y de enfermedades cardiovasculares e inmunológicas. Aunque se podría

argumentar que las dosis administradas en la terapia hormonal cruzada son superiores a la exposición ambiental estrogénica, Rochefort (17) ha señalado previamente que los disruptores endocrinos pueden ejercer efectos deletéreos incluso a dosis bajas y Horan et al (118) han identificado un aumento de la sensibilidad a los compuestos ambientales estrogénicos en sucesivas generaciones en modelos animales. No obstante, son necesarios más estudios que evalúen la relevancia clínica de los hallazgos observados y analicen si los cambios celulares son localizados o sistémicos y su potencial reversibilidad.

## ***CONCLUSIONES***

1. En pacientes de cambio de género, el tratamiento con estrógenos y antiandrógenos a largo plazo provoca cambios morfológicos en todas las células testiculares. Se han identificado tres patrones histológicos de atrofia progresiva de los tubos seminíferos en función de la severidad de las lesiones morfológicas e inmunohistoquímicas, observándose desdiferenciación de las células de Sertoli y atrofia de células intersticiales y de la vía espermática.
2. Se describen por primera vez lesiones de vasculitis asociadas o no a infiltrados inflamatorios del intersticio testicular o de la vía espermática y una elevada frecuencia de lesiones ateroscleróticas en estas pacientes.
3. Hay una correlación entre la severidad de las lesiones morfológicas según el patrón histológico predominante y la edad, siendo mayor en aquellas pacientes que iniciaron el tratamiento a partir de los 40 años y en las que recibieron tratamiento durante 4-8 años.
4. Los hallazgos obtenidos son semejantes a los descritos en el síndrome de disgenesia testicular, lo que apoya el efecto que se ha sugerido tienen los estrógenos en los primeros momentos del desarrollo testicular en este síndrome.
5. Dadas las lesiones vasculares observadas y no esperadas y el aumento de la severidad de las lesiones a medida que aumentaba la dosis de estrógenos administrada, la terapia hormonal cruzada debería ser administrada en unidades especializadas con el objetivo de estandarizar los tratamientos y extremar el control de las dosis y duración de los

tratamientos, en orden a obtener los resultados buscados con las dosis más adecuadas.

## ***REFERENCIAS***



## Referencias

1. Zondek B. Mass excretion of oestrogenic hormone in the urine of the stallion. *Nature*. 1934; 133: 209-210.
2. Forchielli E, Rao GS, Sarda IR, Gibree NB, Pochi PE, Strauss JS, Dorfman RI. Effect of ethinyloestradiol on plasma testosterone levels and urinary testosterone excretion in man. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1965; 50: 51-54.
3. Masson G, Selye H. Changes in the accessory sex organs of the male rat after administration of estradiol in combination with progesterone or desoxycorticosterone acetate. *Am J Pathol*. 1943; 19: 1-7.
4. Light AE, Tornabene JA. Effects of prolonged percutaneous administration of methyl testosterone and estradiol on growing male rats. *J Nutr*. 1953; 49: 51-63.
5. Levine S, Mullins R Jr. Estrogen administered neonatally affects adult sexual behavior in male and female rats. *Science*; 1964;144: 185-187.
6. Heard RD, Jellinck PH, O'Donnell VJ. Biogenesis of the estrogens: the conversion of testosterone-4-C14 to estrone in the pregnant mare. *Endocrinology* 1955; 57: 200-4.
7. Payne AH, Kelch RP, Musich SS, Halpern ME. Intratesticular site of aromatization in the human. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 42: 1081-7.
8. MacDonald PC, Madden JD, Brenner PF, Wilson JD, Siiteri PK. Origin of estrogen in normal men and in women with testicular feminization. *J Clin Endocrinol Metab*. 1979;49: 905-16.
9. Kurosumi M, Ishimura K, Fujita H, Osawa Y. Immunocytochemical localization of aromatase in rat testis. *Histochemistry*. 1985; 83: 401-4.
10. Inkster S, Yue W, Brodie A. Human testicular aromatase: immunocytochemical and biochemical studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80: 1941-7.
11. Greco TL, Furlow JD, Duello TM, Gorski J. Immunodetection of estrogen receptors in fetal and neonatal male mouse reproductive tracts. *Endocrinology* 1992; 130: 421-9.
12. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90:11162-6.
13. Schulster M, Bernie AM, Ramasamy R. The role of estradiol in male reproductive function. *Asian J Androl*. 2016; 18:435-40.
14. Dostalova P, Zatecka E, Dvorakova-Hortova K. Of Oestrogens and Sperm: A Review of the Roles of Oestrogens and Oestrogen Receptors in Male Reproduction. *Int J Mol Sci*. 2017; 18:904.
15. Cooke PS, Nanjappa MK, Ko C, Prins GS, Hess RA. Estrogens in Male Physiology. *Physiol Rev*. 2017; 97:995-1043.
16. Xing JS, Bai ZM. Is testicular dysgenesis syndrome a genetic, endocrine, or environmental disease, or an unexplained reproductive disorder? *Life Sci*. 2018; 194:120-129.
17. Rochefort H. Endocrine disruptors (EDs) and hormone-dependent cancers: Correlation or causal relationship? *C R Biol*. 2017; 340:439-445.
18. Petrakis D, Vassilopoulou L, Mamoulakis C, Psycharakis C, Anifantaki A, Sifakis S, et al. Endocrine disruptors leading to obesity and related diseases. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2017;14: 1282.
19. Sikka SC, Wang R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian J Androl*. 2008; 10:134-45.

20. Bhatia R, Shiao R, Petreas M, Weintraub JM, Farhang L, Eskenazi B. Organochlorine pesticides and male genital anomalies in the child health and development studies. *Environ Health Perspect.* 2005; 113:220-4.
21. Mendiola J, Jørgensen N, Andersson AM, Calafat AM, Ye X, Redmon JB, Drobnis EZ, Wang C, Sparks A, Thurston SW, Liu F, Swan SH. Are environmental levels of bisphenol a associated with reproductive function in fertile men? *Environ Health Perspect.* 2010;118: 1286-91.
22. Giwercman A. Estrogens and phytoestrogens in male infertility. *Curr Opin Urol.* 2011; 21:519-26.
23. Chighizola C, Meroni PL. The role of environmental estrogens and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2012;11: A493-501.
24. Turo R, Smolski M, Esler R, Kujawa ML, Bromage SJ, Oakley N, Adeyoku A, Brown SC, Brough R, Sinclair A, Collins GN. Diethylstilboestrol for the treatment of prostate cancer: past, present and future. *Scand J Urol.* 2014; 48:4-14.
25. Condappa A, Gossell-Williams M, Aiken W. Favourable response of serum prostate-specific antigen to conjugated oestrogen in castrate-resistant prostate cancer in Jamaica. *Ecancermedicallscience.* 2018; 12:829.
26. Unger CA. Hormone therapy for transgender patients. *Transl Androl Urol.* 2016; 5:877-884.
27. Maraka S, Singh Ospina N, Rodriguez-Gutierrez R, Davidge-Pitts CJ, Nippoldt TB, Prokop LJ, Murad MH. Sex Steroids and Cardiovascular Outcomes in Transgender Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102: 3914-3923.
28. Zarkavelis G, Kollas A, Kampletsas E, Vasiliou V, Kaltsonoudis E, Drosos A, Khaled H, Pavlidis N. Aromatase inhibitors induced autoimmune disorders in patients with breast cancer: A review. *J Adv Res.* 2016; 7:719-726.
29. De La Balze FA, Mancini RE, Bur GE, Irazu J. Morphologic and histochemical changes produced by estrogens on adult human testes. *Fertil Steril.* 1954;5: 421-36.
30. Schulze C. Response of the human testis to long-term estrogen treatment: morphology of Sertoli cells, Leydig cells and spermatogonial stem cells. *Cell Tissue Res.* 1988; 251:31-43.
31. Nistal M, Gonzalez-Peramato P, De Miguel MP. Sertoli cell dedifferentiation in human cryptorchidism and gender reassignment shows similarities between fetal environmental and adult medical treatment estrogen and antiandrogen exposure. *Reprod Toxicol.* 2013; 42:172-9.
32. Leavy M, Trottmann M, Liedl B, Reese S, Stief C, Freitag B, Baugh J, Spagnoli G, Kölle S. Effects of Elevated  $\beta$ -Estradiol Levels on the Functional Morphology of the Testis - New Insights. *Sci Rep.* 2017; 7:39931.
33. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev.* 1994; 15:342-55.
34. Carreau S, Wolczynski S, Galeraud-Denis I. Aromatase, oestrogens and human male reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010; 365:1571-9.
35. Biegon A. In vivo visualization of aromatase in animals and humans. *Front Neuroendocrinol.* 2016; 40:42-51.
36. Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M. Aromatase--a brief overview. *Annu Rev Physiol.* 2002; 64:93-127.
37. Saunders PT, Sharpe RM, Williams K, Macpherson S, Urquart H, Irvine DS, Millar MR. Differential expression of oestrogen receptor alpha and beta proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Mol Hum Reprod.* 2001; 7:227-36.

38. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betax: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26:3505-12.
39. Wiik A, Glenmark B, Ekman M, Esbjörnsson-Liljedahl M, Johansson O, Bodin K, Enmark E, Jansson E. Oestrogen receptor beta is expressed in adult human skeletal muscle both at the mRNA and protein level. *Acta Physiol Scand.* 2003; 179:381-7.
40. Thornton MJ, Taylor AH, Mulligan K, Al-Azzawi F, Lyon CC, O'Driscoll J, Messenger AG. Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. *Exp Dermatol.* 2003; 12:181-90.
41. Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001; 81:1535-65.
42. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem.* 1997; 272:19858-62.
43. Scobie GA, Macpherson S, Millar MR, Groome NP, Romana PG, Saunders PT. Human oestrogen receptors: differential expression of ER alpha and beta and the identification of ER beta variants. *Steroids.* 2002; 67:985-92.
44. Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minutolo F. Estrogen receptors alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids.* 2014; 90:13-29.
45. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem.* 2001; 276:36869-72.
46. Li X, Li H, Jia L, Li X, Rahman N. Oestrogen action and male fertility: experimental and clinical findings. *Cell Mol Life Sci.* 2015; 72:3915-30.
47. Gamage N, Barnett A, Hempel N, Duggleby RG, Windmill KF, Martin JL, McManus ME. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol Sci.* 2006; 90:5-22.
48. Page ST. Physiologic role and regulation of intratesticular sex steroids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2011; 18:217-23.
49. Vermeulen A, Kaufman JM, Goemaere S, van Pottelberg I. Estradiol in elderly men. *Aging Male.* 2002; 5: 98-102.
50. Kelch RP, Jenner MR, Weinstein R, Kaplan SL, Grumbach MM. Estradiol and testosterone secretion by human, simian, and canine testes, in males with hypogonadism and in male pseudohermaphrodites with the feminizing testes syndrome. *J Clin Invest.* 1972; 51:824-30.
51. Abraham GE, Odell WD, Swerdloff RS, Hopper K. Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, and estradiol-17 beta during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1972; 34:312-8.
52. Bourguiba S, Lambard S, Carreau S. Steroids control the aromatase gene expression in purified germ cells from the adult male rat. *J Mol Endocrinol.* 2003; 31:83-94.
53. Carreau S, Papadopoulos V, Drosowsky MA. Stimulation of adult rat Leydig cell aromatase activity by a Sertoli cell factor. *Endocrinology.* 1988; 122:1103-9.
54. Rago V, Romeo F, Giordano F, Malivindi R, Pezzi V, Casaburi I, Carpino A. Expression of oestrogen receptors (GPER, ESR1, ESR2) in human ductuli efferentes and proximal epididymis. *Andrology.* 2018;6: 192-198.
55. Pentikäinen V, Erkkilä K, Suomalainen L, Parvinen M, Dunkel L. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:2057-67.
56. Correia S, Cardoso HJ, Cavaco JE, Socorro S. Oestrogens as apoptosis regulators in mammalian testis: angels or devils? *Expert Rev Mol Med.* 2015;17: e2.

57. Subramanian M, Shaha C. Up-regulation of Bcl-2 through ERK phosphorylation is associated with human macrophage survival in an estrogen microenvironment. *J Immunol.* 2007; 179:2330-8.
58. Chimento A, Sirianni R, Casaburi I, Ruggiero C, Maggiolini M, Andò S, Pezzi V. 17 $\beta$ -Estradiol activates GPER- and ESR1-dependent pathways inducing apoptosis in GC-2 cells, a mouse spermatocyte-derived cell line. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 355:49-59.
59. Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, Sonntag-Buck V, Gannon F. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J.* 2000; 19:4688-700.
60. Luetjens CM, Didolkar A, Kliesch S, Paulus W, Jeibmann A, Böcker W, Nieschlag E, Simoni M. Tissue expression of the nuclear progesterone receptor in male non-human primates and men. *J Endocrinol.* 2006; 189:529-39.
61. Hayes FJ, Seminara SB, Decruz S, Boepple PA, Crowley WF Jr. Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:3027-35.
62. Balasiner NH, D'Souza R, Nanaware P, Idicula-Thomas S, Kedia-Mokashi N, He Z, Dym M. Effect of high intratesticular estrogen on global gene expression and testicular cell number in rats. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010; 8:72.
63. Fietz D, Ratzenböck C, Hartmann K, Raabe O, Kliesch S, Weidner W, Klug J, Bergmann M. Expression pattern of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and G-protein-coupled estrogen receptor 1 in the human testis. *Histochem Cell Biol.* 2014; 142:421-32.
64. Aschim EL, Saether T, Wiger R, Grotmol T, Haugen TB. Differential distribution of splice variants of estrogen receptor beta in human testicular cells suggests specific functions in spermatogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004; 92:97-106.
65. Cavaco JE, Laurentino SS, Barros A, Sousa M, Socorro S. Estrogen receptors alpha and beta in human testis: both isoforms are expressed. *Syst Biol Reprod Med.* 2009; 55:137-44.
66. Zaitzu M, Narita S, Lambert KC, Grady JJ, Estes DM, Curran EM, Brooks EG, Watson CS, Goldblum RM, Midoro-Horiuti T. Estradiol activates mast cells via a non-genomic estrogen receptor-alpha and calcium influx. *Mol Immunol.* 2007; 44:1977-85.
67. Brand H, Kos M, Denger S, Flouriot G, Gromoll J, Gannon F, Reid G. A novel promoter is involved in the expression of estrogen receptor alpha in human testis and epididymis. *Endocrinology.* 2002;143: 3397-404.
68. Lucas TF, Nascimento AR, Pisolato R, Pimenta MT, Lazari MF, Porto CS. Receptors and signaling pathways involved in proliferation and differentiation of Sertoli cells. *Spermatogenesis.* 2014;4: e28138.
69. Sandner F, Welter H, Schwarzer JU, Köhn FM, Urbanski HF, Mayerhofer A. Expression of the oestrogen receptor GPER by testicular peritubular cells is linked to sexual maturation and male fertility. *Andrology.* 2014;2: 695-701.
70. Heinrich A, DeFalco T. Essential roles of interstitial cells in testicular development and function. *Andrology.* 2020;8: 903-914.
71. Chimento A, Sirianni R, Zolea F, Bois C, Delalande C, Andò S, Maggiolini M, Aquila S, Carreau S, Pezzi V. Gper and ESRs are expressed in rat round spermatids and mediate oestrogen-dependent rapid pathways modulating expression of cyclin B1 and Bax. *Int J Androl.* 2011; 34:420-9.
72. Dumasia K, Kumar A, Deshpande S, Sonawane S, Balasiner NH. Differential roles of estrogen receptors, ESR1 and ESR2, in adult rat spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2016; 428:89-100.
73. Correia S, Alves MR, Cavaco JE, Oliveira PF, Socorro S. Estrogenic regulation of testicular expression of stem cell factor and c-kit: implications in germ cell survival and male fertility. *Fertil Steril.* 2014; 102:299-306.
74. Sirianni R, Chimento A, Ruggiero C, De Luca A, Lappano R, Andò S, Maggiolini M, Pezzi V. The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line. *Endocrinology.* 2008; 149:5043-51.

75. Yu W, Zheng H, Lin W, Tajima A, Zhang Y, Zhang X, Zhang H, Wu J, Han D, Rahman NA, Korach KS, Gao GF, Inoue I, Li X. Estrogen promotes Leydig cell engulfment by macrophages in male infertility. *J Clin Invest*. 2014; 124:2709-21.
76. Bernardino RL, Costa AR, Martins AD, Silva J, Barros A, Sousa M, Sá R, Alves MG, Oliveira PF. Estradiol modulates Na<sup>(+)</sup>-dependent HCO<sub>3</sub><sup>(-)</sup> transporters altering intracellular pH and ion transport in human Sertoli cells: A role on male fertility? *Biol Cell*. 2016;108: 179-88.
77. Stocco DM. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol*. 2001;63: 193-213.
78. Grimaldi P, Pucci M, Di Siena S, Di Giacomo D, Pirazzi V, Geremia R, Maccarrone M. The faah gene is the first direct target of estrogen in the testis: role of histone demethylase LSD1. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69:4177-90.
79. Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Alterations of activities of cytosolic phospholipase A2 and arachidonic acid-metabolizing enzymes in di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced testicular atrophy. *J Vet Med Sci*. 2004; 66:1119-24.
80. Labow RS, Meek E, Adams GA, Rock G. Inhibition of human platelet phospholipase A2 by mono(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect*. 1988;78: 179-83.
81. Rato L, Alves MG, Socorro S, Duarte AI, Cavaco JE, Oliveira PF. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat Rev Urol*. 2012; 9:330-8.
82. Sylvester SR, Griswold MD. The testicular iron shuttle: a "nurse" function of the Sertoli cells. *J Androl*. 1994; 15:381-5.
83. Griffin KP, Ward DT, Liu W, Stewart G, Morris ID, Smith CP. Differential expression of divalent metal transporter DMT1 (Slc11a2) in the spermatogenic epithelium of the developing and adult rat testis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;288:C176-84.
84. Peters JM, Taubeneck MW, Keen CL, Gonzalez FJ. Di(2-ethylhexyl) phthalate induces a functional zinc deficiency during pregnancy and teratogenesis that is independent of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Teratology*. 1997;56: 311-6.
85. Rato L, Socorro S, Cavaco JE, Oliveira PF. Tubular fluid secretion in the seminiferous epithelium: ion transporters and aquaporins in Sertoli cells. *J Membr Biol*. 2010; 236:215-24.
86. Joseph A, Shur BD, Ko C, Chambon P, Hess RA. Epididymal hypo-osmolality induces abnormal sperm morphology and function in the estrogen receptor alpha knockout mouse. *Biol Reprod*. 2010; 82:958-67.
87. Clulow J, Jones RC, Hansen LA. Micropuncture and cannulation studies of fluid composition and transport in the ductuli efferentes testis of the rat: comparisons with the homologous metanephric proximal tubule. *Exp Physiol*. 1994; 79:915-28.
88. Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*. 1997;390: 509-512.
89. Sullivan R, Légaré C, Lamontagne-Proulx J, Breton S, Soulet D. Revisiting structure/functions of the human epididymis. *Andrology*. 2019;7: 748-757.
90. Hamden K, Silandre D, Delalande C, Elfeki A, Carreau S. Protective effects of estrogens and caloric restriction during aging on various rat testis parameters. *Asian J Androl*. 2008; 10:837-45.
91. Nam SY, Baek IJ, Lee BJ, In CH, Jung EY, Yon JM, Ahn B, Kang JK, Yu WJ, Yun YW. Effects of 17beta-estradiol and tamoxifen on the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA expression in male reproductive organs of rats. *J Reprod Dev*. 2003; 49:389-96.
92. Mikhailov AT, Torrado M. Carboxylesterases moonlight in the male reproductive tract: a functional shift pivotal for male fertility. *Front Biosci*. 2000;5: E53-62.

93. Borrás C, Gambini J, Gómez-Cabrera MC, Sastre J, Pallardó FV, Mann GE, Viña J. 17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. *Aging Cell*. 2005;4: 113-8.
94. Guttman JA, Kimel GH, Vogl AW. Dynein and plus-end microtubule-dependent motors are associated with specialized Sertoli cell junction plaques (ectoplasmic specializations). *J Cell Sci*. 2000; 113:2167-76.
95. Newton SC, Blaschuk OW, Millette CF. N-cadherin mediates Sertoli cell-spermatogenic cell adhesion. *Dev Dyn*. 1993; 197:1-13.
96. MacCalman CD, Getsios S, Farookhi R, Blaschuk OW. Estrogens potentiate the stimulatory effects of follicle-stimulating hormone on N-cadherin messenger ribonucleic acid levels in cultured mouse Sertoli cells. *Endocrinology*. 1997; 138:41-8.
97. Upadhyay RD, Kumar AV, Ganeshan M, Balasinar NH. Tubulobulbar complex: cytoskeletal remodeling to release spermatozoa. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012; 10:27.
98. D'Souza R, Pathak S, Upadhyay R, Gaonkar R, D'Souza S, Sonawane S, Gill-Sharma M, Balasinar NH. Disruption of tubulobulbar complex by high intratesticular estrogens leading to failed spermiation. *Endocrinology*. 2009; 150:1861-9.
99. Luconi M, Muratori M, Forti G, Baldi E. Identification and characterization of a novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84:1670-8.
100. Rodriguez-Rigau LJ, Tcholakian RK, Smith KD, Steinberger E. In vitro steroid metabolic studies in human testes I: Effects of estrogen on progesterone metabolism. *Steroids*. 1977; 29:771-86.
101. Calogero AE, Burrello N, Barone N, Palermo I, Grasso U, D'Agata R. Effects of progesterone on sperm function: mechanisms of action. *Hum Reprod*. 2000; 15:28-45.
102. Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Forti G. Nongenomic effects of progesterone on spermatozoa: mechanisms of signal transduction and clinical implications. *Front Biosci*. 1998;3: d1051-1059.
103. Santen RJ. Is aromatization of testosterone to estradiol required for inhibition of luteinizing hormone secretion in men? *J Clin Invest*. 1975; 56:1555-63.
104. Marshall JC, Case GD, Valk TW, Corley KP, Sauder SE, Kelch RP. Selective inhibition of follicle-stimulating hormone secretion by estradiol. Mechanism for modulation of gonadotropin responses to low dose pulses of gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Invest*. 1983; 71:248-57.
105. Boepple PA, Hayes FJ, Dwyer AA, Raivio T, Lee H, Crowley WF Jr, Pitteloud N. Relative roles of inhibin B and sex steroids in the negative feedback regulation of follicle-stimulating hormone in men across the full spectrum of seminiferous epithelium function. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93:1809-14.
106. Kaushik MC, Misro MM, Sehgal N, Nandan D. AR versus ER ( $\alpha$ ) expression in the testis and pituitary following chronic estrogen administration in adult rat. *Syst Biol Reprod Med*. 2010; 56:420-30.
107. Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect*. 1995; 103:582-7.
108. Watson CS, Alyea RA, Jeng YJ, Kochukov MY. Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenoestrogens on multiple tissues. *Mol Cell Endocrinol*. 2007; 274:1-7.
109. Narita S, Goldblum RM, Watson CS, Brooks EG, Estes DM, Curran EM, Midoro-Horiuti T. Environmental estrogens induce mast cell degranulation and enhance IgE-mediated release of allergic mediators. *Environ Health Perspect*. 2007; 115:48-52.
110. Blair RM, Fang H, Branham WS, Hass BS, Dial SL, Moland CL, Tong W, Shi L, Perkins R, Sheehan DM. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicol Sci*. 2000; 54:138-53.

111. Mueller GC, Kim UH. Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkyl phenols. *Endocrinology*. 1978; 102:1429-35.
112. Nakamura D, Yanagiba Y, Duan Z, Ito Y, Okamura A, Asaeda N, Tagawa Y, Li C, Taya K, Zhang SY, Naito H, Ramdhan DH, Kamijima M, Nakajima T. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicol Lett*. 2010; 194:16-25.
113. El-Hefnawy T, Hernandez C, Stabile LP. The endocrine disrupting alkylphenols and 4,4'-DDT interfere with estrogen conversion and clearance by mouse liver cytosol. *Reprod Biol*. 2017;17: 185-192.
114. Yoshida R, Fukami M, Sasagawa I, Hasegawa T, Kamatani N, Ogata T. Association of cryptorchidism with a specific haplotype of the estrogen receptor alpha gene: implication for the susceptibility to estrogenic environmental endocrine disruptors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90:4716-21.
115. Nakajima Y, Goldblum RM, Midoro-Horiuti T. Fetal exposure to bisphenol A as a risk factor for the development of childhood asthma: an animal model study. *Environ Health*. 2012; 11:8.
116. Chen B, Chen D, Jiang Z, et al. Effects of estradiol and methoxychlor on Leydig cell regeneration in the adult rat testis. *Int J Mol Sci*. 2014; 15:7812-7826.
117. Lehmann KP, Phillips S, Sar M, Foster PM, Gaido KW. Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci*. 2004; 81:60-8.
118. Horan TS, Marre A, Hassold T, Lawson C, Hunt PA. Germline and reproductive tract effects intensify in male mice with successive generations of estrogenic exposure. *PLoS Genet*. 2017;13: e1006885.
119. Hiroi H, Tsutsumi O, Momoeda M, Takai Y, Osuga Y, Taketani Y. Differential interactions of bisphenol A and 17beta-estradiol with estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta. *Endocr J*. 1999; 46:773-8.
120. Song WC, Qian Y, Sun X, Negishi M. Cellular localization and regulation of expression of testicular estrogen sulfotransferase. *Endocrinology*. 1997;138 :5006-12.
121. Christen V, Crettaz P, Oberli-Schrämml A, Fent K. Antiandrogenic activity of phthalate mixtures: validity of concentration addition. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012; 259:169-76.
122. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*. 2005;308: 1466-9.
123. Singh S, Li SS. Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol A and phthalates. *Int J Mol Sci*. 2012;13: 10143-53.
124. Siklenka K, Erkek S, Godmann M, Lambrot R, McGraw S, Lafleur C, Cohen T, Xia J, Suderman M, Hallett M, Trasler J, Peters AH, Kimmins S. Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. *Science*. 2015;350: aab2006.
125. Hardell L, van Bavel B, Lindström G, Carlberg M, Dreifaldt AC, Wijkström H, Starkhammar H, Eriksson M, Hallquist A, Kolmert T. Increased concentrations of polychlorinated biphenyls, hexachlorobenzene, and chlordanes in mothers of men with testicular cancer. *Environ Health Perspect*. 2003;111: 930-4.
126. McGlynn KA, Quraishi SM, Graubard BI, Weber JP, Rubertone MV, Erickson RL. Persistent organochlorine pesticides and risk of testicular germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100: 663-71.
127. Zhao B, Shen H, Liu F, Liu S, Niu J, Guo F, Sun X. Exposure to organochlorine pesticides is an independent risk factor of hepatocellular carcinoma: a case-control study. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2012; 22:541-8.
128. Seachrist DD, Bonk KW, Ho SM, Prins GS, Soto AM, Keri RA. A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. *Reprod Toxicol*. 2016; 59:167-82.
129. Tse LA, Lee PMY, Ho WM, Lam AT, Lee MK, Ng SSM, He Y, Leung KS, Hartle JC, Hu H, Kan H, Wang F, Ng CF. Bisphenol A and other environmental risk factors for prostate cancer in Hong Kong. *Environ Int*. 2017; 107:1-7.



130. Persson EC, Graubard BI, Evans AA, London WT, Weber JP, LeBlanc A, Chen G, Lin W, McGlynn KA. Dichlorodiphenyltrichloroethane and risk of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2012; 131:2078-84.
131. Gioiosa L, Fissore E, Ghirardelli G, Parmigiani S, Palanza P. Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice. *Horm Behav*. 2007; 52:307-16.
132. Hatcher-Martin JM, Gearing M, Steenland K, Levey AI, Miller GW, Pennell KD. Association between polychlorinated biphenyls and Parkinson's disease neuropathology. *Neurotoxicology*. 2012; 33:1298-304.
133. Palmer JR, Herbst AL, Noller KL, Boggs DA, Troisi R, Titus-Ernstoff L, Hatch EE, Wise LA, Strohsnitter WC, Hoover RN. Urogenital abnormalities in men exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Environ Health*. 2009; 8:37.
134. Ivell R, Heng K, Nicholson H, Anand-Ivell R. Brief maternal exposure of rats to the xenobiotics dibutyl phthalate or diethylstilbestrol alters adult-type Leydig cell development in male offspring. *Asian J Androl*. 2013; 15:261-8.
135. Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect*. 2006; 114:106-12.
136. Lim JE, Lee S, Lee S, Jee SH. Serum persistent organic pollutants levels and stroke risk. *Environ Pollut*. 2018; 233:855-861.
137. Midoro-Horiuti T, Tiwari R, Watson CS, Goldblum RM. Maternal bisphenol a exposure promotes the development of experimental asthma in mouse pups. *Environ Health Perspect*. 2010; 118:273-7.
138. Kimbrough RD, Krouskas CA. Human exposure to polychlorinated biphenyls and health effects: a critical synopsis. *Toxicol Rev*. 2003;22 :217-33.
139. Hengstler JG, Foth H, Gebel T, Kramer PJ, Lilienblum W, Schweinfurth H, Völkel W, Wollin KM, Gundert-Remy U. Critical evaluation of key evidence on the human health hazards of exposure to bisphenol A. *Crit Rev Toxicol*. 2011 ;41:263-91.
140. Huo D, Anderson D, Palmer JR, Herbst AL. Incidence rates and risks of diethylstilbestrol-related clear-cell adenocarcinoma of the vagina and cervix: Update after 40-year follow-up. *Gynecol Oncol*. 2017; 146:566-571.
141. Tournaire M, Devouche E, Espié M, Asselain B, Levadou A, Cabau A, Dunbavand A, Grosclaude P, Epelboin S. Cancer Risk in Women Exposed to Diethylstilbestrol in Utero. *Therapie*. 2015; 70:433-41.
142. Słowikowski BK, Lianeri M, Jagodziński PP. Exploring estrogenic activity in lung cancer. *Mol Biol Rep*. 2017; 44:35-50.
143. Gilligan LC, Rahman HP, Hewitt AM, Sitch AJ, Gondal A, Arvaniti A, Taylor AE, Read ML, Morton DG, Foster PA. Estrogen Activation by Steroid Sulfatase Increases Colorectal Cancer Proliferation via GPER. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017; 102:4435-4447.
144. Eldien MMS, Abdou AG, Rageh T, Abdelrazek E, Elkholy E. Immunohistochemical expression of ER- $\alpha$  and PR in papillary thyroid carcinoma. *Ecancermedicalscience*. 2017; 11:748.
145. Tivnan A, Heilinger T, Ramsey JM, O'Connor G, Pokorny JL, Sarkaria JN, Stringer BW, Day BW, Boyd AW, Kim EL, Lode HN, Cryan SA, Prehn JH. Anti-GD2-ch14.18/CHO coated nanoparticles mediate glioblastoma (GBM)-specific delivery of the aromatase inhibitor, Letrozole, reducing proliferation, migration and chemoresistance in patient-derived GBM tumor cells. *Oncotarget*. 2017;8: 16605-16620.
146. Botteri E, Støer NC, Sakshaug S, Graff-Iversen S, Vangen S, Hofvind S, Ursin G, Weiderpass E. Menopausal hormone therapy and risk of melanoma: Do estrogens and progestins have a different role? *Int J Cancer*. 2017;141: 1763-1770.
147. Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF. A variant of estrogen receptor- $\{\alpha\}$ , hER- $\{\alpha\}$ 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103: 9063-8.



148. Chandhoke G, Shayegan B, Hotte SJ. Exogenous estrogen therapy, testicular cancer, and the male to female transgender population: a case report. *J Med Case Rep.* 2018; 12:373.
149. Prins GS. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. *Endocr Relat Cancer.* 2008; 15:649-56. *Endocr Relat Cancer.* 2008; 15:649-56.
150. Wu S, Ye J, Wang Z, Lin SX, Lu M, Liang Y, Zhu X, Olumi AF, Zhong WD, Wu CL. Expression of aromatase in tumor related stroma is associated with human bladder cancer progression. *Cancer Biol Ther.* 2018; 19:175-180.
151. Ladikou EE, Kassi E. The emerging role of estrogen in B cell malignancies. *Leuk Lymphoma.* 2017; 58:528-539.
152. Park SH, Cheung LW, Wong AS, Leung PC. Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol.* 2008;22: 2085-98.
153. Kamat A, Rajoria S, George A, Suriano R, Shanmugam A, Megwalu U, Prakash PB, Tiwari R, Schantz S. Estrogen-mediated angiogenesis in thyroid tumor microenvironment is mediated through VEGF signaling pathways. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011;137: 1146-53.
154. Hsu HH, Liu CJ, Shen CY, Chen YJ, Chen LM, Kuo WH, Lin YM, Chen RJ, Tsai CH, Tsai FJ, Huang CY. p38 $\alpha$  MAPK mediates 17 $\beta$ -estradiol inhibition of MMP-2 and -9 expression and cell migration in human lovo colon cancer cells. *J Cell Physiol.* 2012; 227:3648-60.
155. Di Leva G, Piovan C, Gasparini P, Nganheu A, Taccioli C, Briskin D, Cheung DG, Bolon B, Anderlucci L, Alder H, Nuovo G, Li M, Iorio MV, Galasso M, Santhanam R, Marcucci G, Perrotti D, Powell KA, Bratasz A, Garofalo M, Nephew KP, Croce CM. Estrogen mediated-activation of miR-191/425 cluster modulates tumorigenicity of breast cancer cells depending on estrogen receptor status. *PLoS Genet.* 2013;9: e1003311.
156. Cutolo M, Sulli A, Straub RH. Estrogen's effects in chronic autoimmune/inflammatory diseases and progression to cancer. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014; 10:31-9.
157. Javurek AB, Spollen WG, Ali AM, Johnson SA, Lubahn DB, Bivens NJ, Bromert KH, Ellersieck MR, Givan SA, Rosenfeld CS. Discovery of a Novel Seminal Fluid Microbiome and Influence of Estrogen Receptor Alpha Genetic Status. *Sci Rep.* 2016; 6:23027.
158. Mitropoulou TN, Tzanakakis GN, Kletsas D, Kalofonos HP, Karamanos NK. Letrozole as a potent inhibitor of cell proliferation and expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) by human epithelial breast cancer cells. *Int J Cancer.* 2003; 104:155-60.
159. Bereshchenko O, Bruscoli S, Riccardi C. Glucocorticoids, Sex Hormones, and Immunity. *Front Immunol.* 2018; 9:1332.
160. Rakoff-Nahoum S. Why cancer and inflammation? *Yale J Biol Med.* 2006; 79:123-30.
161. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 2005; 23:1011-27.
162. Zhao G, Nie Y, Lv M, He L, Wang T, Hou Y. ER $\beta$ -mediated estradiol enhances epithelial mesenchymal transition of lung adenocarcinoma through increasing transcription of midkine. *Mol Endocrinol.* 2012; 26:1304-1315.
163. Kowalska K, Piastowska-Ciesielska AW. Oestrogens and oestrogen receptors in prostate cancer. *Springerplus.* 2016; 5:522.
164. Nelles JL, Hu WY, Prins GS. Estrogen action and prostate cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2011; 6:437-451.
165. Braun H, Nash R, Tangpricha V, Brockman J, Ward K, Goodman M. Cancer in Transgender People: Evidence and Methodological Considerations. *Epidemiol Rev.* 2017; 39:93-107.

166. Cunha FS, Domenice S, Câmara VL, Sircili MH, Gooren LJ, Mendonça BB, Costa EM. Diagnosis of prolactinoma in two male-to-female transsexual subjects following high-dose cross-sex hormone therapy. *Andrologia*. 2015; 47:680-4.
167. Nota NM, Burke SM, den Heijer M, Soleman RS, Lambalk CB, Cohen-Kettenis PT, Veltman DJ, Kreukels BP. Brain sexual differentiation and effects of cross-sex hormone therapy in transpeople: A resting-state functional magnetic resonance study. *Neurophysiol Clin*. 2017; 47:361-370.
168. Bergoglio MT, Gómez-Balaguer M, Almonacid Folch E, Hurtado Murillo F, Hernández-Mijares A. Symptomatic meningioma induced by cross-sex hormone treatment in a male-to-female transsexual. *Endocrinol Nutr*. 2013; 60:264-7.
169. Gooren L, Bowers M, Lips P, Konings IR. Five new cases of breast cancer in transsexual persons. *Andrologia*. 2015; 47:1202-5.
170. Teoh ZH, Archampong D, Gate T. Breast cancer in male-to-female (MtF) transgender patients: is hormone receptor negativity a feature? *BMJ Case Rep*. 2015; 2015: bcr2015209396.
171. Sattari M. Breast cancer in male-to-female transgender patients: a case for caution. *Clin Breast Cancer*. 2015;15: e67-9.
172. Dorff TB, Shazer RL, Nepomuceno EM, Tucker SJ. Successful treatment of metastatic androgen-independent prostate carcinoma in a transsexual patient. *Clin Genitourin Cancer*. 2007; 5:344-6.
173. Bostwick DG. Grading prostate cancer. *Am J Clin Pathol*. 1994;102: S38-56.
174. Kovats S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell Immunol*. 2015; 294: 63-69.
175. Nadkarni S, McArthur S. Oestrogen and immunomodulation: new mechanisms that impact on peripheral and central immunity. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13: 576-81.
176. Bonds RS, Midoro-Horiuti T. Estrogen effects in allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2013; 13:92-9.
177. Dai R, Phillips RA, Zhang Y, Khan D, Crasta O, Ahmed SA. Suppression of LPS-induced Interferon-gamma and nitric oxide in splenic lymphocytes by select estrogen-regulated microRNAs: a novel mechanism of immune modulation. *Blood*. 2008;112: 4591-7.
178. Cai Y, Zhou J, Webb DC. Estrogen stimulates Th2 cytokine production and regulates the compartmentalisation of eosinophils during allergen challenge in a mouse model of asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012; 158:252-60.
179. Priyanka HP, Krishnan HC, Singh RV, Hima L, Thyagarajan S. Estrogen modulates in vitro T cell responses in a concentration- and receptor-dependent manner: effects on intracellular molecular targets and antioxidant enzymes. *Mol Immunol*. 2013; 56:328-39.
180. Hill L, Jeganathan V, Chinnasamy P, Grimaldi C, Diamond B. Differential roles of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in control of B-cell maturation and selection. *Mol Med*. 2011; 17:211-20.
181. Ackerman LS. Sex hormones and the genesis of autoimmunity. *Arch Dermatol*. 2006; 142:371-6.
182. Fish EN. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8:737-44.
183. Kim MS, Chae HJ, Shin TY, Kim HM, Kim HR. Estrogen regulates cytokine release in human mast cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2001; 23:495-504.
184. Atkinson HA, Miller K. Inhibitory effect of deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and zearalenone on induction of rat and human lymphocyte proliferation. *Toxicol Lett*. 1984; 23:215-21.
185. Naito M, Hirai S, Terayama H, Qu N, Hayashi S, Hatayama N, Kawamura H, Nakano T, Itoh M. Neonatal estrogen treatment with  $\beta$ -estradiol 17-cypionate induces in post-pubertal mice inflammation in the ductuli

- efferentes, epididymis, and vas deferens, but not in the testis, provoking obstructive azoospermia. *Med Mol Morphol*. 2014; 47:21-30.
186. Li X, Strauss L, Kaatrasalo A, Mayerhofer A, Huhtaniemi I, Santti R, Mäkelä S, Poutanen M. Transgenic mice expressing p450 aromatase as a model for male infertility associated with chronic inflammation in the testis. *Endocrinology*. 2006;147: 1271-7.
  187. Gaytan F, Carrera G, Pinilla L, Aguilar R, Bellido C. Mast cells in the testis, epididymis and accessory glands of the rat: effects of neonatal steroid treatment. *J Androl*. 1989; 10:351-8.
  188. Di Matteo L, Vitiello II, Minucci S. Effects of sex steroid hormones and their antagonists on mast cell number in the testis of the frog, *Rana esculenta*. *Zygote*. 2000;8: 225-34.
  189. Valor L, Teijeiro R, Aristimuño C, Faure F, Alonso B, de Andrés C, Tejera M, López-Lazareno N, Fernández-Cruz E, Sánchez-Ramón S. Estradiol-dependent perforin expression by human regulatory T-cells. *Eur J Clin Invest*. 2011; 41:357-64.
  190. Guo H, Liu T, Uemura Y, Jiao S, Wang D, Lin Z, Narita Y, Suzuki M, Hirose N, Ichihara Y, Ishihara O, Kikuchi H, Sakamoto Y, Senju S, Zhang Q, Ling F. Bisphenol A in combination with TNF- $\alpha$  selectively induces Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with an estrogen-like activity. *Cell Mol Immunol*. 2010;7: 227-34.
  191. Ansar Ahmed S, Penhale WJ, Talal N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol*. 1985; 121:531-51.
  192. Lahita RG, Bradlow HL, Kunkel HG, Fishman J. Alterations of estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1979; 22:1195-8.
  193. Chailurkit LO, Aekplakorn W, Ongphiphadhanakul B. The relationship between circulating estradiol and thyroid autoimmunity in males. *Eur J Endocrinol*. 2013; 170:63-7.
  194. Baker Frost D, Wolf B, Peoples C, Fike J, Silver K, Laffoon M, Medsger TA Jr, Feghali-Bostwick C. Estradiol levels are elevated in older men with diffuse cutaneous SSc and are associated with decreased survival. *Arthritis Res Ther*. 2019; 21:85.
  195. Wozniak AL, Bulayeva NN, Watson CS. Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor- $\alpha$ -mediated  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ Health Perspect*. 2005; 113:431-9.
  196. Kharrazian D. The Potential Roles of Bisphenol A (BPA) Pathogenesis in Autoimmunity. *Autoimmune Dis*. 2014; 2014:743616.
  197. Panchanathan R, Liu H, Choubey D. Expression of murine Unc93b1 is up-regulated by interferon and estrogen signaling: implications for sex bias in the development of autoimmunity. *Int Immunol*. 2013; 25:521-9.
  198. Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh HL, Kim YM. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol*. 2007; 177:265-75.
  199. Pauklin S, Sernández IV, Bachmann G, Ramiro AR, Petersen-Mahrt SK. Estrogen directly activates AID transcription and function. *J Exp Med*. 2009; 206:99-111.
  200. Delpy L, Douin-Echinard V, Garidou L, Bruand C, Saoudi A, Guéry JC. Estrogen enhances susceptibility to experimental autoimmune myasthenia gravis by promoting type 1-polarized immune responses. *J Immunol*. 2005;175: 5050-7.
  201. Behjati S, Frank MH. The effects of tamoxifen on immunity. *Curr Med Chem*. 2009; 16:3076-80.
  202. Vaucher L, Funaro MG, Mehta A, Mielnik A, Bolyakov A, Prossnitz ER, Schlegel PN, Paduch DA. Activation of GPER-1 estradiol receptor downregulates production of testosterone in isolated rat Leydig cells and adult human testis. *PLoS One*. 2014;9: e92425.

203. Furman D, Hejblum BP, Simon N, Jojic V, Dekker CL, Thiébaud R, Tibshirani RJ, Davis MM. Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111:869-74.
204. Gubbels Bupp MR, Jorgensen TN. Androgen-Induced Immunosuppression. *Front Immunol*. 2018;9: 794.
205. Rettew JA, Huet-Hudson YM, Marriott I. Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biol Reprod*. 2008;78: 432-7.
206. Bodin J, Bølling AK, Becher R, Kuper F, Løvik M, Nygaard UC. Transmaternal bisphenol A exposure accelerates diabetes type 1 development in NOD mice. *Toxicol Sci*. 2014; 137:311-23.
207. Williams WV. Hormonal contraception and the development of autoimmunity: A review of the literature. *Linacre Q*. 2017; 84:275-295.
208. Baptista MZ, Prieto VG, Chon S, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Tamoxifen-related vasculitis. *J Clin Oncol*. 2006; 24:3504-5.
209. Betto P, Gennari E, Germi L, Bonoldi E, Scalco G, Tosti A. Tamoxifen and purpuric vasculitis: a case report. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008; 22:762-3.
210. Drago F, Arditi M, Rebora A. Tamoxifen and purpuric vasculitis. *Ann Intern Med*. 1990; 112:965-6.
211. Portman MA, Navarro SL, Bruce ME, Lampe JW. Soy isoflavone intake is associated with risk of Kawasaki disease. *Nutr Res*. 2016; 36:827-34.
212. Campochiaro C, Host LV, Ong VH, Denton CP. Development of systemic sclerosis in transgender females: a case series and review of the literature. *Clin Exp Rheumatol*. 2018;36 Suppl 113:50-52.
213. Santos-Ocampo AS. New onset systemic lupus erythematosus in a transgender man: possible role of feminizing sex hormones. *J Clin Rheumatol*. 2007; 13:29-30.
214. Chan KL, Mok CC. Development of systemic lupus erythematosus in a male-to-female transsexual: the role of sex hormones revisited. *Lupus*. 2013; 22:1399-402.
215. Morselli E, Santos RS, Criollo A, Nelson MD, Palmer BF, Clegg DJ. The effects of oestrogens and their receptors on cardiometabolic health. *Nat Rev Endocrinol*. 2017; 13:352-364.
216. Everson GT, McKinley C, Kern F Jr. Mechanisms of gallstone formation in women. Effects of exogenous estrogen (Premarin) and dietary cholesterol on hepatic lipid metabolism. *J Clin Invest*. 1991; 87:237-46.
217. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80:3689-98.
218. Coban N, Onat A, Guclu-Geyik F, Can G, Erginel-Unaltuna N. Sex- and Obesity specific association of aromatase (CYP19A1) gene variant with apolipoprotein B and hypertension. *Arch Med Res*. 2015; 46: 564-571.
219. Wierckx K, Elaut E, Declercq E, Heylens G, De Cuypere G, Taes Y, Kaufman JM, T'Sjoen G. Prevalence of cardiovascular disease and cancer during cross-sex hormone therapy in a large cohort of trans persons: a case-control study. *Eur J Endocrinol*. 2013; 169: 471-8.
220. Narayanan K, Havmoeller R, Reinier K, Jerger K, Teodorescu C, Uy-Evanado A, Navarro J, Huertas-Vazquez A, Gunson K, Jui J, Chugh SS. Sex hormone levels in patients with sudden cardiac arrest. *Heart Rhythm*. 2014; 11: 2267-2272.
221. Murakami H, Harada N, Sasano H. Aromatase in atherosclerotic lesions of human aorta. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001; 79:67-74.
222. Preyer S, Kaiserling E, Heinle H, Földi E, Zenner HP, Földi M. Benign supraclavicular tumorous lymphangiectasia—a new disease? *Lymphology*. 1995;28: 118-25.

223. Sparey C, Sissons G, Haddad N, Rosser S, de Cossart L. Serial colour flow duplex scanning of the veins of the lower limb throughout pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol.* 1999; 106:557-62.
224. Sobel V, Schwartz B, Zhu YS, Cordero JJ, Imperato-McGinley J. Bone mineral density in the complete androgen insensitivity and 5alpha-reductase-2 deficiency syndromes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:3017-23.
225. Johnson BJ, Anderson PT, Meiske JC, Dayton WR. Effect of a combined trenbolone acetate and estradiol implant on feedlot performance, carcass characteristics, and carcass composition of feedlot steers. *J Anim Sci.* 1996; 74:363-71.
226. Wiik A, Gustafsson T, Esbjörnsson M, Johansson O, Ekman M, Sundberg CJ, Jansson E. Expression of oestrogen receptor alpha and beta is higher in skeletal muscle of highly endurance-trained than of moderately active men. *Acta Physiol Scand.* 2005; 184: 105-112.
227. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med.* 1994;331: 1056-61.
228. Bernard V, Kherra S, Francou B, Fagart J, Viengchareun S, Guéchet J, Ladjouze A, Guiochon-Mantel A, Korach KS, Binart N, Lombès M, Christin-Maitre S. Familial multiplicity of estrogen insensitivity associated with a loss-of-function ESR1 mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016; 102: 93-99.
229. Caraher MC, Sophocleous A, Beattie JR, O'Driscoll O, Cummins NM, Brennan O, O'Brien FJ, Ralston SH, Bell SEJ, Towler M, Idris AI. Raman spectroscopy predicts the link between claw keratin and bone collagen structure in a rodent model of oestrogen deficiency. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864: 398-406.
230. Diamond TH, Higano CS, Smith MR, Guise TA, Singer FR. Osteoporosis in men with prostate carcinoma receiving androgen-deprivation therapy: recommendations for diagnosis and therapies. *Cancer.* 2004; 100:892-9.
231. T'Sjoen G, Weyers S, Taes Y, Lapauw B, Toye K, Goemaere S, Kaufman JM. Prevalence of low bone mass in relation to estrogen treatment and body composition in male-to-female transsexual persons. *J Clin Densitom.* 2009; 12:306-13.
232. Cooke PS, Naaz A. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004; 229:1127-35.
233. Anderson LA, McTernan PG, Barnett AH, Kumar S. The effects of androgens and estrogens on preadipocyte proliferation in human adipose tissue: influence of gender and site. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:5045-51.
234. Naaz A, Zakroczymski M, Heine P, Taylor J, Saunders P, Lubahn D, Cooke PS. Effect of ovariectomy on adipose tissue of mice in the absence of estrogen receptor alpha (ERalpha): a potential role for estrogen receptor beta (ERbeta). *Horm Metab Res.* 2002; 34:758-63.
235. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:12729-34.
236. Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach KS, Simpson ER. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med.* 1997; 337:91-5.
237. Kim JH, Cho HT, Kim YJ. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. *Endocr J.* 2014; 61:1055-67.
238. Gallagher CJ, Langefeld CD, Gordon CJ, Campbell JK, Mychaleckyj JC, Bryer-Ash M, Rich SS, Bowden DW, Sale MM. Association of the estrogen receptor-alpha gene with the metabolic syndrome and its component traits in African-American families: the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. *Diabetes.* 2007; 56:2135-41.
239. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquió M, Gauthier BR, Nef S, Stefani E, Nadal A. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One.* 2008;3: e2069.

240. Le May C, Chu K, Hu M, Ortega CS, Simpson ER, Korach KS, Tsai MJ, Mauvais-Jarvis F. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:9232-7.
241. Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S, Simpson ER. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:12735-40.
242. Vikan T, Schirmer H, Njølstad I, Svartberg J. Low testosterone and sex hormone-binding globulin levels and high estradiol levels are independent predictors of type 2 diabetes in men. *Eur J Endocrinol*. 2010; 162:747-54.
243. Byar DP, Corle DK. Hormone therapy for prostate cancer: results of the Veterans Administration Cooperative Urological Research Group studies. *NCI Monogr*. 1988; 7:165-70.
244. Lew R, Komesaroff P, Williams M, Dawood T, Sudhir K. Endogenous estrogens influence endothelial function in young men. *Circ Res*. 2003; 93: 1127-1133.
245. Sudhir K, Chou TM, Messina LM, Hutchison SJ, Korach KS, Chatterjee K, Rubanyi GM. Endothelial dysfunction in a man with disruptive mutation in oestrogen-receptor gene. *Lancet*. 1997;349: 1146-1147.
246. Mügge A, Riedel M, Barton M, Kuhn M, Lichtlen PR. Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 beta-oestradiol in vitro. *Cardiovasc Res*. 1993; 27:1939-42.
247. Gonzales RJ, Kanagy NL. Endothelium-independent relaxation of vascular smooth muscle by 17beta-estradiol. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 1999; 4:227-234.
248. Haas E, Meyer MR, Schurr U, Bhattacharya I, Minotti R, Nguyen HH, Heigl A, Lachat M, Genoni M, Barton M. Differential effects of 17beta-estradiol on function and expression of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, and GPR30 in arteries and veins of patients with atherosclerosis. *Hypertension*. 2007; 49:1358-63.
249. Koh KK. Effects of estrogen on the vascular wall: vasomotor function and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2002; 55:714-26.
250. Raffetto JD, Qiao X, Beauregard KG, Khalil RA. Estrogen receptor-mediated enhancement of venous relaxation in female rat: implications in sex-related differences in varicose veins. *J Vasc Surg*. 2010; 51:972-81.
251. Nettleship JE, Jones TH, Channer KS, Jones RD. Physiological testosterone replacement therapy attenuates fatty streak formation and improves high-density lipoprotein cholesterol in the Tfm mouse: an effect that is independent of the classic androgen receptor. *Circulation*. 2007; 116:2427-34.
252. Gong Y, Xiao H, Li C, Bai J, Cheng X, Jin M, Sun B, Lu Y, Shao Y, Tian H. Elevated t/e2 ratio is associated with an increased risk of cerebrovascular disease in elderly men. *PLoS One*. 2013;8: e61598.
253. Nofer JR. Estrogens and atherosclerosis: insights from animal models and cell systems. *J Mol Endocrinol*. 2012;48: R13-R29.
254. Tse J, Martin-McNulty B, Halks-Miller M, Kauser K, DeVecchio V, Vergona R, Sullivan ME, Rubanyi GM. Accelerated atherosclerosis and premature calcified cartilaginous metaplasia in the aorta of diabetic male Apo E knockout mice can be prevented by chronic treatment with 17 beta-estradiol. *Atherosclerosis*. 1999; 144:303-13.
255. Stamler J, Pick R, Katz LN. Prevention of coronary atherosclerosis by estrogen-androgen administration in the cholesterol-fed chick. *Circ Res*. 1953; 1:94-8.
256. Elhage R, Arnal JF, Pieraggi MT, Duverger N, Fiévet C, Faye JC, Bayard F. 17 beta-estradiol prevents fatty streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17:2679-84.
257. Buko VU, Lukivskaya O, Naruta E, Popov Y, Chirkin A, Chirkina I, Oettel M, Römer W, Hübler D. Antiatherogenic effects of 17 beta-estradiol and 17 alpha- estradiol and its derivative J811 in cholesterol-fed rabbits with thyroid inhibition. *Climacteric*. 2001; 4:49-57.

258. Dai-Do D, Espinosa E, Liu G, Rabelink TJ, Julmy F, Yang Z, Mahler F, Lüscher TF. 17 beta-estradiol inhibits proliferation and migration of human vascular smooth muscle cells: similar effects in cells from postmenopausal females and in males. *Cardiovasc Res*. 1996; 32:980-5.
259. Levy A, Crown A, Reid R. Endocrine intervention for transsexuals. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003; 59:409-18.
260. Haffner SM, Valdez RA, Stern MP, Katz MS. Obesity, body fat distribution and sex hormones in men. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1993;17: 643-649.
261. Phillips GB, Castelli WP, Abbott RD, McNamara PM. Association of hyperestrogenemia and coronary heart disease in men in the Framingham cohort. *Am J Med*. 1983; 74: 863-869.
262. Maffei L, Murata Y, Rochira V, Tubert G, Aranda C, Vazquez M, Clyne CD, Davis S, Simpson ER, Carani C. Dysmetabolic syndrome in a man with a novel mutation of the aromatase gene: effects of testosterone, alendronate, and estradiol treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:61-70.
263. Sudhir K, Chou TM, Chatterjee K, Smith EP, Williams TC, Kane JP, Malloy MJ, Korach KS, Rubanyi GM. Premature coronary artery disease associated with a disruptive mutation in the estrogen receptor gene in a man. *Circulation*. 1997; 96: 3774-3777.
264. Wassmann S, Bäumer AT, Strehlow K, van Eickels M, Grohé C, Ahlbory K, Rösen R, Böhm M, Nickenig G. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2001; 103:435-41.
265. Beitelshes AL, Johnson JA, Hames ML, Gong Y, Cooper-Dehoff RM, Wu J, Cresci S, Ma CX, Pepine CJ, Province MA, Spertus JA, McLeod HL. Aromatase gene polymorphisms are associated with survival among patients with cardiovascular disease in a sex-specific manner. *PLoS One*. 2010;5: e15180.
266. Brand FN, Dannenberg AL, Abbott RD, Kannel WB. The epidemiology of varicose veins: the Framingham Study. *Am J Prev Med*. 1988; 4:96-101.
267. Beebe-Dimmer JL, Pfeifer JR, Engle JS, Schottenfeld D. The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. *Ann Epidemiol*. 2005; 15:175-84.
268. Kendler M, Blendinger Ch, Haas E. Elevated serum estradiol/testosterone ratio in men with primary varicose veins compared with a healthy control group. *Angiology*. 2009; 60:283-9.
269. Raffetto JD, Ross RL, Khalil RA. Matrix metalloproteinase 2-induced venous dilation via hyperpolarization and activation of K<sup>+</sup> channels: relevance to varicose vein formation. *J Vasc Surg*. 2007; 45:373-80.
270. Dang Y, Li W, Tran V, Khalil RA. EMMPRIN-mediated induction of uterine and vascular matrix metalloproteinases during pregnancy and in response to estrogen and progesterone. *Biochem Pharmacol*. 2013; 86:734-47.
271. Gerstman BB, Piper JM, Tomita DK, Ferguson WJ, Stadel BV, Lundin FE. Oral contraceptive estrogen dose and the risk of deep venous thromboembolic disease. *Am J Epidemiol*. 1991;133: 32-7.
272. Vafeiadi M, Roumeliotaki T, Myridakis A, Chalkiadaki G, Fthenou E, Dermitzaki E, Karachaliou M, Sarri K, Vassilaki M, Stephanou EG, Kogevinas M, Chatzi L. Association of early life exposure to bisphenol A with obesity and cardiometabolic traits in childhood. *Environ. Res*. 2016; 146:379-387.
273. Troisi R, Hyer M, Hatch EE, Titus-Ernstoff L, Palmer JR, Strohshitter WC, Herbst AL, Adam E, Hoover RN. Medical conditions among adult offspring prenatally exposed to diethylstilbestrol. *Epidemiology*. 2013;24: 430-8.
274. Lauver D, Nelles KK, Hanson K. The health effects of diethylstilbestrol revisited. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2005; 34:494-9.
275. Su TC, Hwang JS, Torng PL, Wu C, Lin CY, Sung FC. Phthalate exposure increases subclinical atherosclerosis in young population. *Environ Pollut*. 2019; 250: 586-593.



276. Singh-Ospina N, Maraka S, Rodriguez-Gutierrez R, Davidge-Pitts C, Nippoldt TB, Prokop LJ, Murad MH. Effect of Sex Steroids on the Bone Health of Transgender Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102: 3904-3913.
277. Wierckx K, Mueller S, Weyers S, Van Caenegem E, Roef G, Heylens G, T'Sjoen G. Long-term evaluation of cross-sex hormone treatment in transsexual persons. *J Sex Med.* 2012; 9:2641-51.
278. Resmini E, Andraghetti G, Rebora A, Cordera R, Vera L, Giusti M, Minuto F, Ferone D. Leptin, ghrelin, and adiponectin evaluation in transsexual subjects during hormonal treatments. *J Androl.* 2008; 29:580-5.
279. van Kesteren PJ, Asscheman H, Megens JA, Gooren LJ. Mortality and morbidity in transsexual subjects treated with cross-sex hormones. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1997; 47:337-42.
280. Johnson JV, Lowell J, Badger GJ, Rosing J, Tchaikovski S, Cushman M. Effects of oral and transdermal hormonal contraception on vascular risk markers: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol.* 2008;111 :278-84.
281. Garcia-Segura LM, Veiga S, Sierra A, Melcangi RC, Azcoitia I. Aromatase: a neuroprotective enzyme. *Prog Neurobiol.* 2003; 71:31-41.
282. Piechota M, Korostynski M, Golda S, Ficek J, Jantas D, Barbara Z, Przewlocki R. Transcriptional signatures of steroid hormones in the striatal neurons and astrocytes. *BMC Neurosci.* 2017; 18:37.
283. Kishi Y, Takahashi J, Koyanagi M, Morizane A, Okamoto Y, Horiguchi S, Tashiro K, Honjo T, Fujii S, Hashimoto N. Estrogen promotes differentiation and survival of dopaminergic neurons derived from human neural stem cells. *J Neurosci Res.* 2005; 79:279-86.
284. Biewenga E, Cabell L, Audesirk T. Estradiol and raloxifene protect cultured SN4741 neurons against oxidative stress. *Neurosci Lett.* 2005;373 :179-83.
285. Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids.* 2007; 72:381-405.
286. Bossé R, DiPaolo T. The modulation of brain dopamine and GABAA receptors by estradiol: a clue for CNS changes occurring at menopause. *Cell Mol Neurobiol.* 1996; 16:199-212.
287. Hilgier W, Łazarewicz JW, Strużyńska L, Frontczak-Baniewicz M, Albrecht J. Repeated exposure of adult rats to Aroclor 1254 induces neuronal injury and impairs the neurochemical manifestations of the NMDA receptor-mediated intracellular signaling in the hippocampus. *Neurotoxicology.* 2012; 33:16-22.
288. Castelló-Ruiz M, Torregrosa G, Burguete MC, Miranda FJ, Centeno JM, López-Morales MA, Gasull T, Alborch E. The selective estrogen receptor modulator, bazedoxifene, reduces ischemic brain damage in male rat. *Neurosci Lett.* 2014;575: 53-7.
289. Soustiel JF, Palzur E, Nevo O, Thaler I, Vlodavsky E. Neuroprotective anti-apoptosis effect of estrogens in traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2005 ;22:345-52.
290. Day NL, Floyd CL, D'Alessandro TL, Hubbard WJ, Chaudry IH. 17 $\beta$ -estradiol confers protection after traumatic brain injury in the rat and involves activation of G protein-coupled estrogen receptor 1. *J Neurotrauma.* 2013; 30:1531-41.
291. Saldanha CJ, Duncan KA, Walters BJ. Neuroprotective actions of brain aromatase. *Front Neuroendocrinol.* 2009; 30:106-18.
292. de Jong S, Huisman M, Sutedia N, van der Kooi A, de Visser M, Schelhaas J, van der Schouw Y, Veldink J, van den Berg L. Endogenous female reproductive hormones and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 2013; 260:507-12.
293. Lee SJ, Romeo RD, Svenningsson P, Campomanes CR, Allen PB, Greengard P, McEwen BS. Estradiol affects spinophilin protein differently in gonadectomized males and females. *Neuroscience.* 2004; 127:983-8.



294. Liu F, Day M, Muñiz LC, Bitran D, Arias R, Revilla-Sanchez R, Grauer S, Zhang G, Kelley C, Pulito V, Sung A, Mervis RF, Navarra R, Hirst WD, Reinhart PH, Marquis KL, Moss SJ, Pangalos MN, Brandon NJ. Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci.* 2008; 11:334-43.
295. Hajszan T, MacLusky NJ, Johansen JA, Jordan CL, Leranath C. Effects of androgens and estradiol on spine synapse formation in the prefrontal cortex of normal and testicular feminization mutant male rats. *Endocrinology.* 2007; 148:1963-7.
296. Janowsky JS, Chavez B, Orwoll E. Sex steroids modify working memory. *J Cogn Neurosci.* 2000;12 :407-14.
297. Kampen DL, Sherwin BB. Estradiol is related to visual memory in healthy young men. *Behav Neurosci.* 1996; 110:613-7.
298. Luine V, Rodriguez M. Effects of estradiol on radial arm maze performance of young and aged rats. *Behav Neural Biol.* 1994;62: 230-6.
299. Kravitz HM, Meyer PM, Seeman TE, Greendale GA, Sowers MR. Cognitive functioning and sex steroid hormone gene polymorphisms in women at midlife. *Am J Med.* 2006; 119: S94-S102.
300. Schaadt G, Hesse V, Friederici AD. Sex hormones in early infancy seem to predict aspects of later language development. *Brain Lang.* 2015; 141: 70-6.
301. Blattner MS, Mahoney MM. Changes in estrogen receptor signaling alters the timekeeping system in male mice. *Behav Brain Res.* 2015; 294:43-9.
302. Brand T, Kroonen J, Mos J, Slob AK. Adult partner preference and sexual behavior of male rats affected by perinatal endocrine manipulations. *Horm Behav.* 1991; 25:323-41.
303. Honda S, Harada N, Ito S, Takagi Y, Maeda S. Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the cyp19 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 252:445-9.
304. Carani C, Rochira V, Faustini-Fustini M, Balestrieri A, Granata AR. Role of oestrogen in male sexual behaviour: insights from the natural model of aromatase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1999; 51:517-24.
305. Trainor BC, Finy MS, Nelson RJ. Rapid effects of estradiol on male aggression depend on photoperiod in reproductively non-responsive mice. *Horm Behav.* 2008; 53:192-9.
306. Gillies GE, McArthur S. Independent influences of sex steroids of systemic and central origin in a rat model of Parkinson's disease: A contribution to sex-specific neuroprotection by estrogens. *Horm Behav.* 2010; 57:23-34.
307. Gardiner SA, Morrison MF, Mozley PD, Mozley LH, Brensinger C, Bilker W, Newberg A, Battistini M. Pilot study on the effect of estrogen replacement therapy on brain dopamine transporter availability in healthy, postmenopausal women. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2004; 12:621-630.
308. Morale MC, L'Episcopo F, Tirole C, Giaquinta G, Caniglia S, Testa N, Arcieri P, Serra PA, Lupo G, Alberghina M, Harada N, Honda S, Panzica GC, Marchetti B. Loss of aromatase cytochrome P450 function as a risk factor for Parkinson's disease? *Brain Res Rev.* 2008; 57:431-43.
309. Ragonese P, D'Armelio M, Aridon P, Gammino M, Epifanio A, Morgante L, Savettieri G. Risk of Parkinson disease in women: effect of reproductive characteristics. *Neurology.* 2004;62: 2010-2014.
310. Yue X, Lu M, Lancaster T, Cao P, Honda S, Staufenbiel M, Harada N, Zhong Z, Shen Y, Li R. Brain estrogen deficiency accelerates Aβeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102: 19198-203.
311. Ishunina TA, Fischer DF, Swaab DF. Estrogen receptor alpha and its splice variants in the hippocampus in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2007;28 :1670-81.

312. Pirskanen M, Hiltunen M, Mannermaa A, Helisalmi S, Lehtovirta M, Hänninen T, Soininen H. Estrogen receptor beta gene variants are associated with increased risk of Alzheimer's disease in women. *Eur J Hum Genet.* 2005; 13:1000-6.
313. Iivonen S, Corder E, Lehtovirta M, Helisalmi S, Mannermaa A, Vepsäläinen S, Hänninen T, Soininen H, Hiltunen M. Polymorphisms in the CYP19 gene confer increased risk for Alzheimer disease. *Neurology.* 2004; 62:1170-6.
314. Perlman WR, Tomaskovic-Crook E, Montague DM, Webster MJ, Rubinow DR, Kleinman JE, Weickert CS. Alteration in estrogen receptor alpha mRNA levels in frontal cortex and hippocampus of patients with major mental illness. *Biol Psychiatry.* 2005; 58:812-24.
315. Weickert CS, Miranda-Angulo AL, Wong J, Perlman WR, Ward SE, Radhakrishna V, Straub RE, Weinberger DR, Kleinman JE. Variants in the estrogen receptor alpha gene and its mRNA contribute to risk for schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 2008;17: 2293-309.
316. Keyes K, Agnew-Blais J, Roberts AL, Hamilton A, De Vivo I, Ranu H, Koenen K. The role of allelic variation in estrogen receptor genes and major depression in the Nurses Health Study. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* 2015;50: 1893-904.
317. Braun JM, Yolton K, Dietrich KN, Hornung R, Ye X, Calafat AM, Lanphear BP. Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior. *Environ Health Perspect.* 2009;117: 1945-52.
318. Harley KG, Gunier RB, Kogut K, Johnson C, Bradman A, Calafat AM, Eskenazi B. Prenatal and early childhood bisphenol A concentrations and behavior in school-aged children. *Environ Res.* 2013; 126:43-50.
319. Miodovnik A, Engel SM, Zhu C, Ye X, Soorya LV, Silva MJ, Calafat AM, Wolff MS. Endocrine disruptors and childhood social impairment. *Neurotoxicology.* 2011;32: 261-7.
320. Shao H, Breitner JC, Whitmer RA, Wang J, Hayden K, Wengreen H, Corcoran C, Tschanz J, Norton M, Munger R, Welsh-Bohmer K, Zandi PP; Cache County Investigators. Hormone therapy and Alzheimer disease dementia: new findings from the Cache County Study. *Neurology.* 2012; 79:1846-52.
321. Fuss J, Hellweg R, Van Caenegem E, Briken P, Stalla GK, T'Sjoen G, Auer MK. Cross-sex hormone treatment in male-to-female transsexual persons reduces serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Eur Neuropsychopharmacol.* 2015; 25:95-9.
322. Hilleke P, Cohen-Kettenis P, Haren N, Peper J, Brans R, Cahn W, Schnack H, Gooren L, Kahn R. Changing your sex changes your brain: influences of testosterone and estrogen on adult human brain structure. *Eur J Endocrinol.* 2006;155: S107-S114.
323. Seiger R, Hahn A, Hummer A, Kranz GS, Ganger S, Woletz M, Kraus C, Sladky R, Kautzky A, Kasper S, Windischberger C, Lanzenberger R. Subcortical gray matter changes in transgender subjects after long-term cross-sex hormone administration. *Psychoneuroendocrinology.* 2016; 74:371-379.
324. Kulkarni J, Gavrilidis E, Gwini SM, Worsley R, Grigg J, Warren A, Gurvich C, Gilbert H, Berk M, Davis SR. Effect of adjunctive raloxifene therapy on severity of refractory schizophrenia in women: a randomized clinical trial. *JAMA Psychiatry.* 2016;73 :947-54.
325. Tschiffely AE, Schuh RA, Prokai-Tatrai K, Ottinger MA, Prokai L. An exploratory investigation of brain-selective estrogen treatment in males using a mouse model of Alzheimer's disease. *Horm Behav.* 2018; 98:16-21.
326. Gogos A, Sbisá AM, Sun J, Gibbons A, Udawela M, Dean B. A Role for Estrogen in Schizophrenia: Clinical and Preclinical Findings. *Int J Endocrinol.* 2015; 2015:615356.
327. Chabab A, Nicolas JC, Sultan C. Aromatase activity in human skin fibroblasts: characterization by an enzymatic method. *J Steroid Biochem.* 1986; 25:157-63.
328. Brandenberger AW, Tee MK, Lee JY, Chao V, Jaffe RB. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82: 3509-12.

329. Offidani A, Campanati A. Papillary hidradenoma: immunohistochemical analysis of steroid receptor profile with a focus on apocrine differentiation. *J Clin Pathol.* 1999; 52:829-32.
330. Thornton MJ. The biological actions of estrogens on skin. *Exp Dermatol.* 2002; 11:487-502.
331. Verdier-Sévrain S, Bonté F, Gilchrist B. Biology of estrogens in skin: implications for skin aging. *Exp Dermatol.* 2006; 15:83-94.
332. Kanda N, Watanabe S. 17 $\beta$ -estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression. *J Invest Dermatol.* 2003; 121: 1500-1509.
333. Movérare S, Lindberg MK, Faergemann J, Gustafsson JA, Ohlsson C. Estrogen receptor alpha, but not estrogen receptor beta, is involved in the regulation of the hair follicle cycling as well as the thickness of epidermis in male mice. *J Invest Dermatol.* 2002; 119:1053-8.
334. Hosokawa M, Ishii M, Inoue K, Yao CS, Takeda T. Estrogen induces different responses in dermal and lung fibroblasts: special reference to collagen. *Connect Tissue Res.* 1981;9: 115-20.
335. Grosman N, Hvidberg E, Schou J. The effect of oestrogenic treatment on the acid mucopolysaccharide pattern in skin of mice. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1971; 30:458-64.
336. Snell RS, Turner R. Skin pigmentation in relation to the menstrual cycle. *J Invest Dermatol.* 1966; 47:147-55.
337. Beas F, Vargas L, Spada RP, Merchak N. Pseudoprecocious puberty in infants caused by a dermal ointment containing estrogens. *J Pediatr.* 1969; 75:127-30.
338. Oh HS, Smart RC. An estrogen receptor pathway regulates the telogen-anagen hair follicle transition and influences epidermal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93: 12525-12530.
339. Pochi PE, Strauss JS. Endocrinologic control of the development and activity of the human sebaceous gland. *J Invest Dermatol.* 1974; 62:191-201.
340. Varila E, Rantala I, Oikarinen A, Risteli J, Reunala T, Oksanen H, Punnonen R. The effect of topical oestradiol on skin collagen of postmenopausal women. *Br J Obstet Gynaecol.* 1995; 102:985-9.
341. Engeli RT, Rohrer SR, Vuorinen A, Herdlinger S, Kaserer T, Leugger S, Schuster D, Odermatt A. Interference of Paraben Compounds with Estrogen Metabolism by Inhibition of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Int J Mol Sci.* 2017;18: 2007.
342. Simpson JR. Dermatitis due to parabens in cosmetic creams. *Contact Dermatitis.* 1978; 4:311-2.
343. Sánchez-Pérez J, Díez MB, Pérez AA, Jiménez YD, Díez G. Allergic and systemic contact dermatitis to methylparaben. *Contact Dermatitis.* 2006; 54:117-118.
344. Yip L, Zaloumis S, Irwin D, Severi G, Hopper J, Giles G, Harrap S, Sinclair R, Ellis J. Gene-wide association study between the aromatase gene (CYP19A1) and female pattern hairloss. *Br J Dermatol.* 2009; 161:289-94.
345. Giltay EJ, Gooren LJ. Effects of sex steroid deprivation/administration on hair growth and skin sebum production in transsexual males and females. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85: 2913-21.
346. Gao Y, Maurer T, Mirmirani P. Understanding and Addressing Hair Disorders in Transgender Individuals. *Am J Clin Dermatol.* 2018;19: 517-527.
347. Stevenson MO, Wixon N, Safer JD. Scalp hair regrowth in hormone-treated transgender woman. *Transgender Health.* 2016;1:202-4.
348. Ellem SJ, Schmitt JF, Pedersen JS, Frydenberg M, Risbridger GP. Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89 :2434-41.
349. Strauss L, Rantakari P, Sjögren K, Salminen A, Lauren E, Kallio J, Damdimopoulou P, Boström M, Boström PJ, Pakarinen P, Zhang F, Kujala P, Ohlsson C, Mäkelä S, Poutanen M. Seminal vesicles and urinary

- bladder as sites of aromatization of androgens in men, evidenced by a CYP19A1-driven luciferase reporter mouse and human tissue specimens. *FASEB J.* 2013;27: 1342-50.
350. Murphy JB, Emmott RC, Hicks LL, Walsh PC. Estrogen receptors in the human prostate, seminal vesicle, epididymis, testis, and genital skin: a marker for estrogen-responsive tissues? *J Clin Endocrinol Metab.* 1980; 50:938-48.
351. Chavalmane AK, Comeglio P, Morelli A, Filippi S, Fibbi B, Vignozzi L, Sarchielli E, Marchetta M, Failli P, Sandner P, Saad F, Gacci M, Vannelli GB, Maggi M. Sex steroid receptors in male human bladder: expression and biological function. *J Sex Med.* 2010;7: 2698-713.
352. Corradetti C, Jog NR, Cesaroni M, Madaio M, Caricchio R. Estrogen receptor  $\alpha$  signaling exacerbates immune-mediated nephropathies through alteration of metabolic activity. *J Immunol.* 2018; 200:512-522.
353. Cunha GR, Wang YZ, Hayward SW, Risbridger GP. Estrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. *Reprod Fertil Dev.* 2001; 13:285-96.
354. Risbridger GP, Wang H, Frydenberg M, Cunha G. The metaplastic effects of estrogen on mouse prostate epithelium: proliferation of cells with basal cell phenotype. *Endocrinology.* 2001; 142:2443-50.
355. Gangkak G, Bhattar R, Mittal A, Yadav SS, Tomar V, Yadav A, Mehta J. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in prostate and clinical correlation in men with benign prostatic hyperplasia. *Investig Clin Urol.* 2017; 58:117-126.
356. Nicholson TM, Moses MA, Uchtmann KS, Keil KP, Bjorling DE, Vezina CM, Wood RW, Ricke WA. Estrogen receptor- $\alpha$  is a key mediator and therapeutic target for bladder complications of benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 2015; 193:722-9.
357. Hu WY, Shi GB, Lam HM, Hu DP, Ho SM, Madueke IC, Kajdacsy-Balla A, Prins GS. Estrogen-initiated transformation of prostate epithelium derived from normal human prostate stem-progenitor cells. *Endocrinology.* 2011; 152:2150-63.
358. Davidsson S, Mölling P, Rider JR, Unemo M, Karlsson MG, Carlsson J, Andersson SO, Elgh F, Söderquis B, Andrén O. Frequency and typing of *Propionibacterium acnes* in prostate tissue obtained from men with and without prostate cancer. *Infect Agent Cancer.* 2016;11: 26.
359. Lin W, Rahman NA, Lin J, Zhang H, Gou K, Yu W, Zhu D, Li N, Huhtaniemi I, Li X. Molecular mechanisms of bladder outlet obstruction in transgenic male mice overexpressing aromatase (Cyp19a1). *Am J Pathol.* 2011; 178:1233-44.
360. Hewitson TD, Zhao C, Wigg B, Lee SW, Simpson ER, Boon WC, Samuel CS. Relaxin and castration in male mice protect from, but testosterone exacerbates, age-related cardiac and renal fibrosis, whereas estrogens are an independent determinant of organ size. *Endocrinology.* 2012; 153:188-99.
361. Hajdu A, Rona G. The protective effect of estrogens against spontaneous pancreatic islet and renal changes in aging male rats. *Experientia.* 1971; 27:956-7.
362. Ikeda M, Swide T, Vayl A, Lahm T, Anderson S, Hutchens MP. Estrogen administered after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation ameliorates acute kidney injury in a sex- and age-specific manner. *Crit Care.* 2015; 19:332.
363. Swan SH, Elkin EP, Fenster L. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect.* 1997; 105:1228-32.
364. Haimov-Kochman R, Har-Nir R, Ein-Mor E, Ben-Shoshan V, Greenfield C, Eldar I, Bdolah Y, Hurwitz A. Is the quality of donated semen deteriorating? Findings from a 15 year longitudinal analysis of weekly sperm samples. *Isr Med Assoc J.* 2012; 14:372-7.
365. Sripada S, Fonseca S, Lee A, Harrild K, Giannaris D, Mathers E, Bhattacharya S. Trends in semen parameters in the northeast of Scotland. *J Androl.* 2007;28:313-9.
366. Splingart C, Frapsauce C, Veau S, Barthélémy C, Royère D, Guérif F. Semen variation in a population of fertile donors: evaluation in a French centre over a 34-year period. *Int J Androl.* 2012; 35:467-74.

367. Chul Kim S, Kyoung Kwon S, Pyo Hong Y. Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias of registry-based data in Korea: a comparison between industrialized areas of petrochemical estates and a non-industrialized area. *Asian J Androl*. 2011; 13:715-8.
368. Paulozzi LJ, Erickson JD, Jackson RJ. Hypospadias trends in two US surveillance systems. *Pediatrics*. 1997; 100:831-4.
369. Park JS, Kim J, Elghiaty A, Ham WS. Recent global trends in testicular cancer incidence and mortality. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97: e12390.
370. Ghazarian AA, Kelly SP, Altekruze SF, Rosenberg PS, McGlynn KA. Future of testicular germ cell tumor incidence in the United States: Forecast through 2026. *Cancer*. 2017; 123:2320-2328.
371. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod*. 2001; 16:972-8.
372. Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A. Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism. *Endocr Rev*. 2008; 29:560-80.
373. Leung AK, Robson WL. Hypospadias: an update. *Asian J Androl*. 2007; 9:16-22.
374. Vikraman J, Hutson JM, Li R, Thorup J. The undescended testis: Clinical management and scientific advances. *Semin Pediatr Surg*. 2016; 25:241-8.
375. van der Horst HJ, de Wall LL. Hypospadias, all there is to know. *Eur J Pediatr*. 2017; 176:435-441.
376. Stawińska-Witoszyńska B, Wojtyła-Buciora P, Więckowska B, Krzywinska-Wiewiorowska M, Gromadecka-Sutkiewicz M. Malignant testicular tumour incidence and mortality trends. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2016; 20:58-62.
377. Kopp RP, Chevinsky M, Bernstein M, Bosl G, Motzer R, Bajorin D, Feldman D, Carver BS, Sheinfeld J. Bilateral Testicular. Germ Cell Tumors in the Era of Multimodal Therapy. *Urology*. 2017;103: 154-160.
378. Chemes H, Muzulin PM, Venara MC, Mulhmann Mdel C, Martínez M, Gamboni M. Early manifestations of testicular dysgenesis in children: pathological phenotypes, karyotype correlations and precursor stages of tumour development. *APMIS*. 2003; 111:12-23; discussion 23-4.
379. Lottrup G, Jørgensen A, Nielsen JE, Jørgensen N, Duno M, Vinggaard AM, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E. Identification of a novel androgen receptor mutation in a family with multiple components compatible with the testicular dysgenesis syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98:2223-9.
380. Kanetsky PA, Mitra N, Vardhanabhuti S, Li M, Vaughn DJ, Letrero R, Ciosek SL, Doody DR, Smith LM, Weaver J, Albano A, Chen C, Starr JR, Rader DJ, Godwin AK, Reilly MP, Hakonarson H, Schwartz SM, Nathanson KL. Common variation in KITLG and at 5q31.3 predisposes to testicular germ cell cancer. *Nat Genet*. 2009; 41:811-5.
381. Myrup C, Westergaard T, Schnack T, Oudin A, Ritz C, Wohlfahrt J, Melbye M. Testicular cancer risk in first- and second-generation immigrants to Denmark. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100:41-7.
382. Olesen IA, Sonne SB, Hoei-Hansen CE, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Environment, testicular dysgenesis and carcinoma in situ testis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007;21: 462-78.
383. Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect*. 2000; 108:961-6.
384. Rajpert-De Meyts E. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update*. 2006; 12:303-23.
385. Rajpert-De Meyts E, Jørgensen N, Brøndum-Nielsen K, Müller J, Skakkebaek NE. Developmental arrest of germ cells in the pathogenesis of germ cell neoplasia. *APMIS*. 1998; 106:198-204; discussion 204-6.
386. Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*. 2003; 125:769-84.

387. Wohlfahrt-Veje C, Main KM, Skakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome: foetal origin of adult reproductive problems. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;71: 459-65.
388. Delbès G, Levacher C, Habert R. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction*. 2006; 132:527-38.
389. Welsh M, Saunders PT, Fisker M, Scott HM, Hutchison GR, Smith LB, Sharpe RM. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest*. 2008;118: 1479-90.
390. Raman-Wilms L, Tseng AL, Wighardt S, Einarson TR, Koren G. Fetal genital effects of first-trimester sex hormone exposure: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 1995; 85:141-9.
391. Laguë E, Tremblay JJ. Estradiol represses insulin-like 3 expression and promoter activity in MA-10 Leydig cells. *Toxicology*. 2009; 258:101-5.
392. Hutson JM, Li R, Southwell BR, Newgreen D, Cousinery M. Regulation of testicular descent. *Pediatr Surg Int*. 2015;31: 317-25.
393. Chevalier N, Brucker-Davis F, Lahlou N, Coquillard P, Pugeat M, Pacini P, Panaia-Ferrari P, Wagner-Mahler K, Fénelon P. A negative correlation between insulin-like peptide 3 and bisphenol A in human cord blood suggests an effect of endocrine disruptors on testicular descent during fetal development. *Hum Reprod*. 2015;30: 447-53.
394. Bernstein L, Pike MC, Depue RH, Ross RK, Moore JW, Henderson BE. Maternal hormone levels in early gestation of cryptorchid males: a case-control study. *Br J Cancer*. 1988;58:379-81.
395. Donaldson KM, Tong SY, Washburn T, Lubahn DB, Eddy EM, Hutson JM, Korach KS. Morphometric study of the gubernaculum in male estrogen receptor mutant mice. *J Androl*. 1996; 17:91-5.
396. Nistal M, Paniagua R, González-Peramato P, Reyes-Múgica M. Perspectives in pediatric pathology: chapter 2. Testicular descent. *Pediatr Dev Pathol*. 2015; 18:103-108.
397. Newbold RR, Suzuki Y, McLachlan JA. Müllerian duct maintenance in heterotypic organ culture after in vivo exposure to diethylstilbestrol. *Endocrinology*. 1984; 115:1863-8.
398. Staib P, Kau N, Romalo G, Schweikert HU. Oestrogen formation in genital and non-genital skin fibroblasts cultured from patients with hypospadias. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1994; 41:237-43.
399. Liu B, Agras K, Willingham E, Vilela ML, Baskin LS. Activating transcription factor 3 is estrogen-responsive in utero and upregulated during sexual differentiation. *Horm Res*. 2006; 65:217-22.
400. Liu B, Wang Z, Lin G, Agras K, Ebbers M, Willingham E, Baskin LS. Activating transcription factor 3 is up-regulated in patients with hypospadias. *Pediatr Res*. 2005;58: 1280-3.
401. Robertson KM, O'Donnell L, Jones ME, Meachem SJ, Boon WC, Fisher CR, Graves KH, McLachlan RI, Simpson ER. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96: 7986-91.
402. Gill-Sharma MK, Gopalkrishnan K, Balasinar N, Parte P, Jayaraman S, Juneja HS. Effects of tamoxifen on the fertility of male rats. *J Reprod Fertil*. 1993;99: 395-402.
403. Lübbert H, Leo-Rossberg I, Hammerstein J. Effects of ethinyl estradiol on semen quality and various hormonal parameters in a eugonadal male. *Fertil Steril*. 1992; 58:603-8.
404. Gill-Sharma MK, Dsouza S, Padwal V, Balasinar N, Aleem M, Parte P, Juneja HS. Antifertility effects of estradiol in adult male rats. *J Endocrinol Invest*. 2001;24: 598-607.
405. Srilatha B, Adaikan PG. Estrogen and phytoestrogen predispose to erectile dysfunction: do ER-alpha and ER-beta in the cavernosum play a role? *Urology*. 2004; 63: 382-6.
406. Schlegel PN. Aromatase inhibitors for male infertility. *Fertil Steril*. 2012; 98:1359-62.

407. Elias AN, Valenta LJ, Domurat ES. Male hypogonadism due to nontumorous hyperestrogenism. *J Androl.* 1990;11: 485-90.
408. Smith LB, Walker WH. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin Cell Dev Biol.* 2014; 30:2-13.
409. O'Donnell L, McLachlan RI, Wreford NG, Robertson DM. Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. *Endocrinology.* 1994; 135:2608-14.
410. Guido C, Perrotta I, Panza S, Middea E, Avena P, Santoro M, Marsico S, Imbrogno P, Andò S, Aquila S. Human sperm physiology: estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) influence sperm metabolism and may be involved in the pathophysiology of varicocele-associated male infertility. *J Cell Physiol.* 2011; 226:3403-12.
411. Romerius P, Giwercman A, Moëll C, Relander T, Cavallin-Ståhl E, Wiebe T, Halldén C, Giwercman YL. Estrogen receptor  $\alpha$  single nucleotide polymorphism modifies the risk of azoospermia in childhood cancer survivors. *Pharmacogenet Genomics.* 2011;21: 263-9.
412. Boscia F, Passaro C, Gigantino V, Perdonà S, Franco R, Portella G, Chieffi S, Chieffi P. High levels of GPR30 protein in human testicular carcinoma in situ and seminomas correlate with low levels of estrogen receptor-beta and indicate a switch in estrogen responsiveness. *J Cell Physiol.* 2015; 230:1290-7.
413. Nistal M, Paniagua R. Infertility in adult males with retractile testes. *Fertil Steril.* 1984;41: 395-403.
414. Rogers E, Teahan S, Gallagher H, et al. The role of orchiectomy in the management of postpubertal cryptorchidism. *J Urol.* 1998; 159:851-854.
415. Nistal M, Gonzalez-Peramato P, Regadera J, Serrano A, Tarin V, De Miguel MP. Primary testicular lesions are associated with testicular germ cell tumors of adult men. *Am J Surg Pathol.* 2006;30: 1260-8.
416. Koni A, Ozseker HS, Arpali E, Kilinc E, Dogan HS, Akyol A, Tekgul S. Histopathological evaluation of orchiectomy specimens in 51 late postpubertal men with unilateral cryptorchidism. *J Urol.* 2014; 192:1183-8.
417. Govender D, Sing Y, Chetty R. Sertoli cell nodules in the undescended testis: a histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study of hyaline deposits. *J Clin Pathol.* 2004; 57:802-6.
418. Stosiek P, Kasper M, Karsten U. Expression of cytokeratins 8 and 18 in human Sertoli cells of immature and atrophic seminiferous tubules. *Differentiation.* 1990;43: 66-70.
419. Rogatsch H, Jezek D, Hittmair A, Mikuz G, Feichtinger H. Expression of vimentin, cytokeratin, and desmin in Sertoli cells of human fetal, cryptorchid, and tumour-adjacent testicular tissue. *Virchows Arch.* 1996; 427:497-502.
420. Regadera J, Martínez-García F, González-Peramato P, Serrano A, Nistal M, Suárez-Quian C. Androgen receptor expression in sertoli cells as a function of seminiferous tubule maturation in the human cryptorchid testis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:413-421.
421. Bar-Shira Maymon B, Yavetz H, Yogev L, et al. Detection of calretinin expression in abnormal immature Sertoli cells in non-obstructive azoospermia. *Acta Histochem.* 2005;107: 105-112.
422. Nistal M, Pastríán LG, González-Peramato P, De Miguel MP. Inhibin bodies: a new marker for immature Sertoli cells. *Histopathology.* 2011;58: 1019-1027.
423. Yin Y, Hawkins KL, DeWolf WC, Morgentaler A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl.* 1997; 18:159-165.
424. Santamaria L, Martinez-Onsurbe P, Paniagua R, Nistal M. Laminin, type IV collagen, and fibronectin in normal and cryptorchid human testes. An immunohistochemical study. *Int J Androl.* 1990; 13:135-46.
425. Regadera J, Codesal J, Paniagua R, Gonzalez-Peramato P, Nistal M. Immunohistochemical and quantitative study of interstitial and intratubular Leydig cells in normal men, cryptorchidism, and Klinefelter's syndrome. *J Pathol.* 1991; 164:299-306.



426. Oosterhuis JW, Kersemaekers AM, Jacobsen GK, Timmer A, Steyerberg EW, Molier M, Van Weeren PC, Stoop H, Looijenga LH. Morphology of testicular parenchyma adjacent to germ cell tumours. An interim report. *APMIS*. 2003; 111:32-40; discussion 41-2.
427. Gotoh M, Miyake K, Mitsuya H. Leydig cell hyperplasia in cryptorchid patients: quantitative evaluation of Leydig cells in undescended and contralateral scrotal testes. *Urol Res*. 1984; 12:159-64.
428. Soerensen RR, Johannsen TH, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E. Leydig cell clustering and Reinke crystal distribution in relation to hormonal function in adult patients with testicular dysgenesis syndrome (TDS) including cryptorchidism. *Hormones (Athens)*. 2016;15: 518-526.
429. Nistal M, Castillo MC, Regadera J, García-Cabezas MA. Adenomatous hyperplasia of the rete testis. A review and report of new cases. *Histol Histopathol*. 2003; 18:741-52.
430. Rajalakshmi M, Kumar BV, Kapur MM, Pal PC. Ultrastructural changes in the efferent duct and epididymis of men with obstructive infertility. *Anat Rec*. 1993;237: 199-207.
431. Yuan K, Zhao B, Li XW, Hu GX, Su Y, Chu Y, Akingbemi BT, Lian QQ, Ge RS. Effects of phthalates on 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 3 activities in human and rat testes. *Chem Biol Interact*. 2012; 195:180-8.
432. Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N, Sharpe RM. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod*. 2003;18: 1383-1394.
433. Choi H, Kim J, Im Y, Lee S, Kim Y. The association between some endocrine disruptors and hypospadias in biological samples. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2012;47: 2173-9.
434. Toppari J, Virtanen H, Skakkebaek NE, Main KM. Environmental effects on hormonal regulation of testicular descent. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006; 102:184-6.
435. Rouiller-Fabre V, Guerquin MJ, N'Tumba-Byn T, Muczynski V, Moison D, Tourpin S, Messiaen S, Habert R, Livera G. Nuclear receptors and endocrine disruptors in fetal and neonatal testes: a gapped landscape. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015; 6:58.
436. Richburg JH, Boekelheide K. Mono (2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996; 137:42-50.
437. Li MW, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41:2302-14.
438. Sahin E, Ilgaz C, Erdoğan D, Take G, Göktas G. Protective effects of resveratrol against di-n buthyl phthalate induced toxicity in ductus epididymis and ductus deferens in rats. *Indian J Pharmacol*. 2014; 46:51-6.
439. Akingbemi BT, Ge R, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:775-80.
440. Zhang Y, Piao Y, Li Y, Song M, Tang P, Li C. 4-Nitrophenol induces Leydig cells hyperplasia, which may contribute to the differential modulation of the androgen receptor and estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  expression in male rat testes. *Toxicol Lett*. 2013; 223:228-235.
441. Newbold RR, Bullock BC, McLachlan JA. Lesions of the rete testis in mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Cancer Res*. 1985; 45:5145-50.
442. Zhang Y, Jiang X, Chen B. Reproductive and developmental toxicity in F1 Sprague-Dawley male rats exposed to di-n-butyl phthalate in utero and during lactation and determination of its NOAEL. *Reprod Toxicol*. 2004;18 :669-76.
443. Vidaeff AC, Sever LE. In utero exposure to environmental estrogens and male reproductive health: a systematic review of biological and epidemiologic evidence. *Reprod Toxicol*. 2005; 20:5-20.
444. Manfo FP, Nantia EA, Mathur PP. Effect of environmental contaminants on mammalian testis. *Curr Mol Pharmacol*. 2014; 7:119-35.



445. Sharpe RM. Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. *Toxicol Lett.* 2001; 120:221-32.
446. Lottrup G, Andersson AM, Leffers H, Mortensen GK, Toppari J, Skakkebaek NE, Main KM. Possible impact of phthalates on infant reproductive health. *Int J Androl.* 2006; 29:172-80; discussion 181-5.
447. Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet.* 1993; 341:1392-5.
448. Hembree WC, Cohen-Kettenis PT, Gooren L, Hannema SE, Meyer WJ, Murad MH, Rosenthal SM, Safer JD, Tangpricha V, T'Sjoen GG. Endocrine Treatment of Gender-Dysphoric/Gender-Incongruent Persons: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017; 102:3869-3903.
449. Neumann F. Pharmacology and potential use of cyproterone acetate. *Horm Metab Res.* 1977; 9:1-13.
450. Romero E, Vélez de Mendizabal N, Cendrós JM, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic model of the testosterone effects of triptorelin administered in sustained release formulations in patients with prostate cancer. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;342: 788-798.
451. Asscheman H, Giltay EJ, Megens JA, de Ronde WP, van Trotsenburg MA, Gooren LJ. A long-term follow-up study of mortality in transsexuals receiving treatment with cross-sex hormones. *Eur J Endocrinol.* 2011; 164:635-42.
452. Toorians AW, Thomassen MC, Zweegman S, Magdeleyns EJ, Tans G, Gooren LJ, Rosing J. Venous thrombosis and changes of hemostatic variables during cross-sex hormone treatment in transsexual people. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:5723-9.
453. Meriggiola MC, Berra M. Safety of hormonal treatment in transgenders. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2013; 20:565-569.
454. Wilson R, Spiers A, Ewan J, Johnson P, Jenkins C, Carr S. Effects of high dose oestrogen therapy on circulating inflammatory markers. *Maturitas.* 2009;62: 281-286.
455. Seal LJ, Franklin S, Richards C, Shishkareva A, Sinclair C, Barrett J. Predictive markers for mastoplasmy and a comparison of side effect profiles in transwomen taking various hormonal regimens. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97:4422-8.
456. Payer AF, Meyer WJ 3rd, Walker PA. The ultrastructural response of human Leydig cells to exogenous estrogens. *Andrologia.* 1979; 11: 423-36.
457. Sapino A, Pagani A, Godano A, Bussolati G. Effects of estrogens on the testis of transsexuals: a pathological and immunocytochemical study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1987; 411:409-14.
458. Nistal M, Abaurrea MA, Paniagua R. Morphological and histometric study on the human Sertoli cell from birth to the onset of puberty. *J Anat.* 1982; 134:351-63.
459. Nistal M, Paniagua R, González-Peramato P. Nonneoplastic diseases of the testis. En: Cheng L, MacLennan GT, D.G. Bostwick (Eds.). *Urologic Surgical Pathology.* Elsevier Saunders, Philadelphia; 2020. p. 640-720.
460. Lenz S, Giwercman A, Elsborg A, et al. Ultrasonic testicular texture and size in 444 men from the general population: correlation to semen quality. *Eur Urol.* 1993; 24:231-238.
461. Nistal M, Paniagua R, González-Peramato P, Reyes-Múgica M. Perspectives in pediatric pathology, chapter 4. Pubertal and adult testis. *Pediatr Dev Pathol.* 2015;18: 187-202.
462. Yamanaka K, Fujisawa M, Tanaka H, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. Significance of human testicular mast cells and their subtypes in male infertility. *Hum Reprod.* 2000; 15:1543-7.
463. O'Donnell L. Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis.* 2015; 4: e979623.

464. Dimitriadis F, Tsiampali C, Chaliasos N, Tsounapi P, Takenaka A, Sofikitis N. The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *Hormones (Athens)*. 2015; 14:479-503.
465. De Kretser DM, Kerr JB, Paulsen CA. The peritubular tissue in the normal and pathological human testis. An ultrastructural study. *Biol Reprod*. 1975; 12:317-24.
466. Karsdal MA, Nielsen SH, Leeming DJ, Langholm LL, Nielsen MJ, Manon-Jensen T, Siebuhr A, Gudmann NS, Rønnow S, Sand JM, Daniels SJ, Mortensen JH, Schuppan D. The good and the bad collagens of fibrosis - Their role in signaling and organ function. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017; 121:43-56.
467. Enders GC, Kahsai TZ, Lian G, Funabiki K, Killen PD, Hudson BG. Developmental changes in seminiferous tubule extracellular matrix components of the mouse testis: alpha 3(IV) collagen chain expressed at the initiation of spermatogenesis. *Biol Reprod*. 1995; 53:1489-99.
468. Paniagua R, Rodríguez MC, Nistal M, Fraile B, Regadera J, Amat P. Changes in surface area and number of Leydig cells in relation to the 6 stages of the cycle of the human seminiferous epithelium. *Anat Embryol (Berl)*. 1988;178: 423-7.
469. Abdel-Maksoud FM, Knight R, Waler K, Yaghoubi-Yeganeh N, Olukunle JO, Thompson H, Panizzi JR, Akingbemi BT. Exposures of male rats to environmental chemicals [bisphenol A and di (2-ethylhexyl) phthalate] affected expression of several proteins in the developing epididymis. *Andrology*. 2018; 6:214-222.
470. Hess RA, Bunick D, Lubahn DB, Zhou Q, Bouma J. Morphologic changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor-alpha knockout mice. *J Androl*. 2000;21: 107-121.
471. Mandon M, Hermo L, Cyr DG. Isolated Rat Epididymal Basal Cells Share Common Properties with Adult Stem Cells. *Biol Reprod*. 2015; 93:115.
472. Nistal M, Ifiguez L, Paniagua R. Pitted pattern in the human epididymis. *J Reprod Fertil*. 1990; 89:655-61.
473. Welsh M, Saunders PT, Atanassova N, Sharpe RM, Smith LB. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J*. 2009; 23:4218-30.
474. Shum WW, Da Silva N, McKee M, Smith PJ, Brown D, Breton S. Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell*. 2008;135: 1108-17.
475. Pöllänen P, Niemi M. Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. *Int J Androl*. 1987; 10:37-42.
476. el-Demiry MI, Hargreave TB, Busuttil A, Elton R, James K, Chisholm GD. Immunocompetent cells in human testis in health and disease. *Fertil Steril*. 1987; 48:470-9.
477. Itoh M, Xie Q, Miyamoto K, Takeuchi Y. Major differences between the testis and epididymis in the induction of granulomas in response to extravasated germ cells. I. A light microscopical study in mice. *Int J Androl*. 1999; 22:316-23.
478. Minucci S, Di Matteo L, Chieffi P, Pierantoni R, Fasano S. 17 beta-estradiol effects on mast cell number and spermatogonial mitotic index in the testis of the frog, *Rana esculenta*. *J Exp Zool*. 1997; 278:93-100.
479. Meineke V, Frungieri MB, Jessberger B, Vogt H, Mayerhofer A. Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. *Fertil Steril*. 2000; 74:239-44.
480. Walenta L, Fleck D, Fröhlich T, von Eysmond H, Arnold GJ, Spehr J, Schwarzer JU, Köhn FM, Spehr M, Mayerhofer A. ATP-mediated Events in Peritubular Cells Contribute to Sterile Testicular Inflammation. *Sci Rep*. 2018;8 :1431.
481. Mechlin CW, Levesque J, Feustel P, Kogan BA. Mast cell numbers negatively correlate with fibrosis in cryptorchid testes. *J Pediatr Urol*. 2014; 10:527-31.

482. Manuel Nistal, Pilar González-Peramato, Álvaro Serrano. Vascular pathology related to extracellular material accumulation. En: Springer, editor. *Clues in the Diagnosis of Non-tumoral Testicular Pathology*. 1st ed. Cham: Springer; 2017.p. 219-228.
483. Shurbaji MS, Epstein JI. Testicular vasculitis: implications for systemic disease. *Hum Pathol*. 1988; 19:186-9.
484. Braeckman P, Joniau S, Oyen R, Croes R, Van Poppel H. Polyarteritis nodosa mimicking a testis tumour: a case report and review of the literature. *Cancer Imaging*. 2015; 2:96-98.
485. Hernandez-Rodriguez J, Tan CD, Koenig CL, Khasnis A, Rodríguez ER, Hoffman GS. Testicular vasculitis: findings differentiating isolated disease from systemic disease in 72 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2012; 91:75-85.
486. Wright LF, Bicknell SL. Systemic necrotizing vasculitis presenting as epididymitis. *J Urol*. 1986;136: 1094.
487. Mori T, Durand J, Chen Y, Thompson JA, Bakir S, Oparil S. Effects of short-term estrogen treatment on the neointimal response to balloon injury of rat carotid artery. *Am J Cardiol*. 2000; 85:1276-9.
488. Barud W, Palusiński R, Bełtowski J, Wójcicka G. Inverse relationship between total testosterone and anti-oxidized low density lipoprotein antibody levels in ageing males. *Atherosclerosis*. 2002; 164:283-8.
489. Mayer C, Adam M, Walenta L, Schmid N, Heikelä H, Schubert K, Flenkenthaler F, Dietrich KG, Gruschka S, Arnold GJ, Fröhlich T, Schwarzer JU, Köhn FM, Strauss L, Welter H, Poutanen M, Mayerhofer A. Insights into the role of androgen receptor in human testicular peritubular cells. *Andrology*. 2018; 6:756-765.
490. Ploplis VA. Effects of altered plasminogen activator inhibitor-1 expression on cardiovascular disease. *Curr Drug Targets*. 2011;12: 1782-9.
491. Nistal M, Paniagua R, Abaurrea MA. Multi-vacuolated leydig cells in human adult cryptorchid testes. *Andrologia*. 1981; 13:436-9.
492. Cole S, Matter A, Karnovsky MJ. Autophagic vacuoles in experimental atrophy. *Exp Mol Pathol*. 1971; 14:158-75.
493. Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicol Sci*. 2011; 119:3-19.
494. Nistal M, Garcia-Rodeja E, Paniagua R. Granular transformation of Sertoli cells in testicular disorders. *Hum Pathol*. 1991; 22:131-7.
495. Nistal M, Santamaria L, Paniagua R, Regadera J, Codesal J. Multinucleate Leydig cells in normal human testes. *Andrologia*. 1986;18: 268-72.
496. Bornman MS, Barnhoorn IE, de Jager C, Veeramachaneni DN. Testicular microlithiasis and neoplastic lesions in wild eland (*Tragelaphus oryx*): possible effects of exposure to environmental pollutants? *Environ Res*. 2010; 110:327-33.
497. Serter S, Gümüş B, Unlü M, Tunçyürek O, Tarhan S, Ayyildiz V, Pabuscu Y. Prevalence of testicular microlithiasis in an asymptomatic population. *Scand J Urol Nephrol*. 2006; 40:212-4.
498. Kokotas N, Kontogeorgos L, Kyriakidis A. Calcification of the tunica vaginalis. *Br J Urol*. 1983;55: 128.
499. Sathyanarayana S, Grady R, Barrett ES, Redmon B, Nguyen RHN, Barthold JS, Bush NR, Swan SH. First trimester phthalate exposure and male newborn genital anomalies. *Environ Res*. 2016;151: 777-782.
500. Marchetti C, Hamdane M, Mitchell V, Mayo K, Devisme L, Rigot JM, Beauvillain JC, Hermand E, Defossez A. Immunolocalization of inhibin and activin alpha and betaB subunits and expression of corresponding messenger RNAs in the human adult testis. *Biol Reprod*. 2003; 68:230-5.
501. Rogers JH. Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J Cell Biol*. 1987;105: 1343-53.

502. Pillai S, Bikle DD, Mancianti ML, Cline P, Hincenbergs M. Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J Cell Physiol.* 1990; 143:294-302.
503. Altobelli GG, Pentimalli F, D'Armiento M, Van Noorden S, Cimini V. Calretinin Immunoreactivity in the Human Testis Throughout Fetal Life. *J Cell Physiol.* 2017;232: 1872-1878.
504. Strauss KI, Isaacs KR, Ha QN, Jacobowitz DM. Calretinin is expressed in the Leydig cells of rat testis. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1219: 435-40.
505. Franke FE, Pauls K, Rey R, Marks A, Bergmann M, Steger K. Differentiation markers of Sertoli cells and germ cells in fetal and early postnatal human testis. *Anat Embryol (Berlin).* 2004; 209:169-77.
506. Baupal R, Bailey D, Giwercman A, Skakkebaek N, Stratis M, Marks A. A novel maturation marker for human Sertoli cells. *Int J Androl.* 1989;12:354-9.
507. Augusto D, Leteurtre E, De La Taille A, Gosselin B, Leroy X. Calretinin: a valuable marker of normal and neoplastic Leydig cells of the testis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2002;10: 159-62.
508. Chemes HE, Rey RA, Nistal M, Regadera J, Musse M, González-Peramato P, Serrano A. Physiological androgen insensitivity of the fetal, neonatal, and early infantile testis is explained by the ontogeny of the androgen receptor expression in Sertoli cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93:4408-12.
509. Williams K, McKinnell C, Saunders PT, Walker M, Fisher JS, Turner KJ, Atanassova N, Sharpe M. Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man. *Hum Reprod Update.* 2001;7:236-47.
510. Suárez-Quian CA, Martínez-García F, Nistal M, Regadera J. Androgen receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:350-8.
511. De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lécureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM, Verhoeven G. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:1327-32.
512. Berensztein EB, Baquedano MS, Gonzalez CR, Saraco NI, Rodriguez J, Ponzio R, Rivarola MA, Belgorosky A. Expression of aromatase, estrogen receptor alpha and beta, androgen receptor, and cytochrome P-450scc in the human early prepubertal testis. *Pediatr Res.* 2006; 60:740-4.
513. Rey RA, Musse M, Venara M, Chemes HE. Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. *Microsc Res Tech.* 2009; 72:787-95.
514. Delfino FJ, Boustead JN, Fix C, Walker WH. NF-kappaB and TNF-alpha stimulate androgen receptor expression in Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2003; 201:1-12.
515. Holdcraft RW, Braun RE. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development.* 2004; 131:459-67.
516. Nistal M, Paniagua R, González-Peramato P, Reyes-Múgica M. Perspectives in pediatric pathology, chapter 3. Testicular development from birth to puberty: systematic evaluation of the prepubertal testis. *Pediatr Dev Pathol.* 2015; 18:173-86.
517. Tsai MY, Yeh SD, Wang RS, Yeh S, Zhang C, Lin HY, Tzeng CR, Chang C. Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103: 18975-80.
518. Kawamura K, Kumagai J, Sudo S, Chun SY, Pisarska M, Morita H, Toppari J, Fu P, Wade JD, Bathgate RA, Hsueh AJ. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:7323-8.
519. Magers MJ, Udager AM, Chinnaiyan AM, French D, Myers JL, Jentzen JM, McHugh JB, Heider A, Mehra R. Comprehensive Immunophenotypic Characterization of Adult and Fetal Testes, the Excretory Duct

- System, and Testicular and Epididymal Appendages. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016;24: e50-68.
520. Iwamura M, Abrahamsson PA, Benning CM, Cockett AT, di Sant'Agnese PA. Androgen receptor immunostaining and its tissue distribution in formalin-fixed, paraffin-embedded sections after microwave treatment. *J Histochem Cytochem*. 1994; 42:783-8.
  521. Ruizeveld de Winter JA, Trapman J, Vermey M, Mulder E, Zegers ND, van der Kwast TH. Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem*. 1991; 39:927-36.
  522. Shao R, Ljungström K, Weijdegård B, Egecioglu E, Fernandez-Rodriguez J, Zhang FP, Thurin-Kjellberg A, Bergh C, Billig H. Estrogen-induced upregulation of AR expression and enhancement of AR nuclear translocation in mouse fallopian tubes in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 292: E604-14.
  523. Kilcoyne KR, Smith LB, Atanassova N, Macpherson S, McKinnell C, van den Driesche S, Jobling MS, Chambers TJ, De Gendt K, Verhoeven G, O'Hara L, Platts S, Renato de Franca L, Lara NL, Anderson RA, Sharpe RM. Fetal programming of adult Leydig cell function by androgenic effects on stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111: E1924-32.
  524. Brown TR, Spinola-Castro A, Berkovitz GD, Migeon CJ. Androgen receptor in cultured human testicular fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985; 61:134-41.
  525. Kuroda N, Nakayama H, Miyazaki E, Hayashi Y, Toi M, Hiroi M, Enzan H. Distribution and role of CD34-positive stromal cells and myofibroblasts in human normal testicular stroma. *Histol Histopathol*. 2004;19: 743-51.
  526. Shah C, Modi D, Sachdeva G, Gadkar S, Puri C. Coexistence of intracellular and membrane-bound progesterone receptors in human testis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90:474-83.
  527. Lue Y, Wang C, Lydon JP, Leung A, Li J, Swerdloff RS. Functional role of progesterin and the progesterone receptor in the suppression of spermatogenesis in rodents. *Andrology*. 2013; 1:308-17.
  528. Steger K, Rey R, Louis F, Kliesch S, Behre HM, Nieschlag E, Hoepffner W, Bailey D, Marks A, Bergmann M. Reversion of the differentiated phenotype and maturation block in Sertoli cells in pathological human testis. *Hum Reprod*. 1999; 14:136-43.
  529. Welter H, Kampfer C, Lauf S, Feil R, Schwarzer JU, Köhn FM, Mayerhofer A. Partial loss of contractile marker proteins in human testicular peritubular cells in infertility patients. *Andrology*. 2013;1: 318-24.
  530. Schulze C, Holstein AF. Leydig cells within the lamina propria of seminiferous tubules in four patients with azoospermia. *Andrologia*. 1978;10: 444-52.
  531. Rune GM, Mayr J, Neugebauer H, Anders C, Sauer H. Pattern of Sertoli cell degeneration in cryptorchid prepubertal testes. *Int J Androl*. 1992; 15:19-31.
  532. Wang T, Liu L, Luo J, Liu T, Wei A. A Meta - Analysis of the Relationship between Testicular Microlithiasis and Incidence of Testicular Cancer. *Urol J*. 2015; 12:2057-64.
  533. Patel RP, Kolon TF, Huff DS, Carr MC, Zderic SA, Canning DA, Snyder HM 3rd. Testicular microlithiasis and antisperm antibodies following testicular biopsy in boys with cryptorchidism. *J Urol*. 2005;174: 2008-10; discussion 2010.
  534. Aizenstein RI, DiDomenico D, Wilbur AC, O'Neil HK. Testicular microlithiasis: association with male infertility. *J Clin Ultrasound*. 1998;26:195-8.
  535. Schütte B, Holstein AF, Schirren C. Macrophages lysing seminoma cells in patients with carcinoma-in-situ (CIS) of the testis. *Andrologia*. 1988; 20:295-303.
  536. Frungieri MB, Calandra RS, Lustig L, Meineke V, Köhn FM, Vogt HJ, Mayerhofer A. Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertil Steril*. 2002;78: 298-306.

## Referencias

- 537. Yuksel OH, Verit A, Sahin A, Urkmez A, Uruc F. White blood cell counts and neutrophil to lymphocyte ratio in the diagnosis of testicular cancer a simple secondary serum tumor marker. *Int Braz J Urol.* 2016;42: 53-59.
- 538. Apa DD, Cayan S, Polat A, Akbay E. Mast cells and fibrosis on testicular biopsies in male infertility. *Arch Androl.* 2002; 48:337-44.
- 539. Fleischmann A, Studer UE. Isolated polyarteritis nodosa of the male reproductive system associated with a germ cell tumor of the testis: a case report. *Cardiovasc Pathol.* 2007; 16:354-6.
- 540. Mancini M, Carmignani L, Gazzano G, Sagone P, Gadda F, Bosari S, Rocco F, Colpi GM. High prevalence of testicular cancer in azoospermic men without spermatogenesis. *Hum Reprod.* 2007; 22:1042-6.
- 541. Chen LY, Willis WD, Eddy EM. Targeting the Gdnf Gene in peritubular myoid cells disrupts undifferentiated spermatogonial cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113: 1829-34.
- 542. Themmen APN, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev.* 2000;21: 551-83.
- 543. Wortsman J, Hamidinia A, Winters SJ. Hypogonadism following long-term treatment with diethylstilbestrol. *Am J Med Sci.* 1989; 297:365-8.

## ***ANEXO 1***